

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**Las S6Ks actúan en la ruta de chequeo G2, en *Arabidopsis thaliana*.
Al disminuir su concentración se induce endomitosis y poliploidización y, además,
se compromete el crecimiento de las células en diferenciación.**

TESIS DOCTORAL

María Antonia Monardes Muñoz

**Madrid
2009**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**Las S6Ks actúan en la ruta de chequeo G2, en *Arabidopsis thaliana*.
Al disminuir su concentración se induce endomitosis y poliploidización y, además,
se compromete el crecimiento de las células en diferenciación.**

TESIS DOCTORAL

Autor:

**María Antonia Monardes Muñoz
Bióloga Marina**

Tutor:

Prof. Dr. Carlos García de la Vega (UAM)

Directores:

**Prof. Dra. Consuelo de la Torre García-Quintana
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

**Prof. Dr. Juan Orellana Saavedra
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Universidad Politécnica de Madrid**

Prof. Dr. Carlos García de la Vega, Catedrático de Genética del Departamento de Biología y Vicerrector de Personal Docente e Investigador de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA que ha sido tutor de la tesis “Las S6Ks actúan en la ruta de chequeo G2, en *Arabidopsis thaliana*. Al disminuir su concentración se induce endomitosis y poliploidización y, además, se compromete el crecimiento de las células en diferenciación” que ha sido realizada por la Bióloga Marina D^a María Antonia Monardes Muñoz.

Y para que conste a todos los efectos expido el siguiente certificado en Madrid, a seis de Noviembre de 2009.

Fdo: Prof. Dr. Carlos García de la Vega (UAM)

D^a Consuelo de la Torre García-Quintana, Profesora de Investigación vinculada *ad honorem* al Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid y

D. Juan Orellana Saavedra, Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid

CERTIFICAN que la tesis "Las S6Ks actúan en la ruta de chequeo G2, en *Arabidopsis thaliana*. Al disminuir su concentración se induce endomitosis y poliploidización y, además, se compromete el crecimiento de las células en diferenciación" ha sido realizada por la Bióloga Marina D^a María Antonia Monardes Muñoz, bajo nuestra dirección.

Y para que conste a todos los efectos expedimos el siguiente certificado en Madrid, a seis de Noviembre de 2009.

Fdo: Consuelo de la Torre

Fdo: Juan Orellana

A mis padres,

AGRADECIMIENTOS

Gracias...

En primer lugar, quiero agradecer con gran estima y cariño a mis dos directores de tesis, la Prof. Dra. Consuelo de la Torre y al Prof. Dr. Juan Orellana Saavedra que siempre estuvieron disponibles, mi eterna gratitud por su valiosa dirección y por la confianza que depositaron en mí durante todo este tiempo.

Al Prof. Dr. Carlos García de la Vega, por ser mi tutor en la Universidad Autónoma de Madrid.

Muy especialmente, a Rossana Henriques, a Lázló Bögre y a Zoltan Magyar del Royal Holloway, University of London, School of Biological Sciences.

A todos los miembros de la Unidad de Genética Agraria de la E.T.S.I.A.

A Margarita Carrascosa y José Luis Marcilla, técnicos del laboratorio de Reproducción Celular del Centro de Investigaciones Biológicas.

A todos mis compañeros de laboratorio, gracias: a Susana, a Marta C., a Laura, a Regina, a Jorge, a Samir, a Rachid, a Patricia, a Javi, a Edurne, a Pablo, a Marta R, a Arancha, a Carol, a Araceli, a todos...

A Iris, a Violeta, a Delia, a Luisa y a Merche.

A Víctor.

A todos vosotros, por haber estado conmigo durante los años de tesis en Madrid.

Con todo mi cariño a mis padres, a Jorge, a Rodrigo, a Alejandro, a Andrea y a mi familia que me apoyaron desde Concepción y especialmente a tío Gualo.

FDO: CONSUELO DE LA TORRE	FDO: JUAN ORELLANA.....	4
AGRADECIMIENTOS		6
ABREVIATURAS		3
RESUMEN		5
ABSTRACT.....		6
INTRODUCCIÓN.....		7
1. LA MAQUINARIA QUE CONTROLA EL CICLO CELULAR: ACTIVADORES Y REPRESORES.....		8
2. LAS PROTEÍNCINASAS S6		13
3. LA RUTA DEL COMPLEJO RBR/E2F/DP		17
OBJETIVOS		19
MATERIALES Y MÉTODOS		21
1. ECOTIPO DE ARABIDOPSIS THALIANA		21
2. CULTIVO DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA		22
3. CONSTRUCCIONES		22
4. GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS		2
5. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE HOJAS DE A. THALIANA.....		2
6. OBTENCIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)		3
6.1. Amplificación de secuencias por PCR.....		3
6.2. Marcado de sondas por PCR		4
6.3. Marcado de sondas por cebado al azar (<i>Random Priming</i>).....		5
7. ANÁLISIS DE LAS PLANTAS		5
8. ANÁLISIS CITOLÓGICO.....		6
8.1. Cuantificación del número de cromocentros en células en interfase		7
8.2. Análisis por citometría de flujo		7
8.3. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....		7
8.4. Captura y tratamiento de imágenes		11
9. ANÁLISIS MOLECULAR DE PLANTAS		11
9.1. Extracción de RNA y RT-PCR semi-cuantitativa		11
9.2. Análisis molecular de protoplastos		13
9.2.1. Cultivos de protoplastos.....		13
9.2.2. Co-inmunoprecipitación de S6K1, E2F y RBR1		14
9.2.3. Transfección de protoplastos de <i>Arabidopsis</i> y análisis de proteínas del ciclo celular		14
9.2.4. Ensayos de proteíncinasas.....		15
RESULTADOS		16
1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS CINASAS S6K1 Y S6K2 EN PLANTAS		
++/s6k1s6k2 Y S6K1(XVE-RNAi)		16
1.1. Plantas heterocigotas ++/s6k1s6k2		16
1.2. Plantas S6K1(XVE-RNAi)		18
2. CRECIMIENTO DE PLANTAS HETEROCIGOTAS ++/S6K1S6K2 Y DE PLANTAS		
S6K1(XVE-RNAi)		19
3. PAPEL DE LAS CINASAS S6K EN CÉLULAS SOMÁTICAS EN PROLIFERACIÓN		21
3.1. Tamaño de la hoja y de sus células epidérmicas en relación a la presencia de las proteínas S6K.....		21
3.2. Contenido de DNA en células epidérmicas de la hoja		24
3.3. Valoración de ploidía de las células de plantas WT, ++/s6k1s6k2 y S6K1(XVE-RNAi).....		27
3.3.1. Tinción de cromocentros con DAPI.....		27
3.3.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)		29
3.3.3. Modificación en las estructuras centroméricas		33
3.4. Determinación del número de cromocentros por tinción con DAPI.....		35
3.5. Determinación del número de centrómeros por FISH.....		40
3.5.1. Determinación del número total de centrómeros por la sonda pAL1b		40
3.5.2. Determinación del número de cromosomas 1 mediante la sonda paracentromérica pAR21		47
4. PAPEL DE LAS CINASAS S6K EN CÉLULAS DIFERENCIADAS:		
ESTOMAS Y TRICOMAS FOLIARES		53
4.1. Estomas.....		53
4.2. Tricomas		55
5. PAPEL DE LAS CINASAS S6K EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR QUE TIENE LUGAR DURANTE EL		
DESARROLLO FLORAL		58

6. ANÁLISIS DE ANTERAS Y SILICUAS	59
7. VIABILIDAD DE LAS SEMILLA	61
8. LA PLOIDÍA DE GAMETOFITOS MASCULINOS, DETERMINADA POR FISH	62
9. LA PRESENCIA DE LAS CINASAS S6K EN PROTOPLASTOS REDUCE LA ACTIVIDAD FOSFORILATIVA DE CDKS SOBRE LA HISTONA H1	66
10. LOS GENES S6K SON REPRESORES DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUE CONTROLAN ESPECÍFICAMENTE EL G2.....	69
11. INHIBICIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN CDKB1;1 POR LAS CINASAS S6K	70
DISCUSIÓN	72
1. LAS CINASAS S6KS ASEGURAN EL DESARROLLO NORMAL DE LA PARTE AÉREA DE LA PLANTA	72
2. LA ORGANOGÉNESIS COMO INTERACCIÓN ENTRE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN	72
3. REGULACIÓN POSITIVA Y NEGATIVA DEL CICLO CELULAR.....	75
3.1. Las rutas de chequeo.....	75
3.2. La adaptación a la parada inducida por rutas de chequeo	76
4. LA CINASAS S6 COMO PROTEÍNA DE CHEQUEO EN PROLIFERACIÓN CELULAR	78
4.1. Las cinasas S6Ks reprimen la transcripción de genes que controlan la progresión del ciclo celular en protoplastos.....	79
4.2. Las represión de la CDKB1;1 por S6K1 en protoplastos.....	82
5. LA DISMINUCIÓN DE CINASAS S6 INDUCE ENDOMITOSIS QUE RESULTA EN POLIPLOIDIZACIÓN.....	83
5.1. La inducción de endomitosis	83
5.2. Determinación de ploidía por citometría de flujo y por FISH	86
5.3. La existencia de variaciones en la condensación y descondensación de secuencias centroméricas	89
6. EFECTO DE LAS S6KS EN EL TAMAÑO FINAL DE LAS CÉLULAS DIFERENCIADAS DE LA EPIDERMIS DE LA HOJA	89
7. LA FORMACIÓN DE ESTOMAS EN LA HOJA ES INDEPENDIENTE DEL CONTENIDO EN CINASAS S6.....	90
8. LA POLITENÍA ESPONTÁNEA DEL TRICOMA Y SU RESPUESTA A LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS CINASAS S6.....	91
9. CAMBIOS EN LA FÓRMULA FLORAL, ANTERAS Y SILICUAS Y EN LA PLOIDÍA DEL GAMETOFITO MASCULINO QUE ACOMPAÑAN A LA DISMINUCIÓN DE LAS CINASAS S6	93
CONCLUSIONES	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

A: adenina

ATP: adenosín trifosfato

Biotina-16-dUTP: biotina-16-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato

Ccs: cromocentros, regiones condensadas de heterocromatina centromérica que organizan los anillos del cromosoma interfásico en *Arabidopsis*

CycD: ciclina D que interviene en la transición G1 a S

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

Dig-11-dUTP: digoxigenina-11-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: 2'-deoxinucleótido-5'-trifosfato

DP: *dimerization partner* (compañero en la formación de un dímero)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (sal sódica)

FISH: hibridación *in situ* con sonda fluorescente

G1: *Gap1*: etapa del ciclo celular post-mitótica y pre-replicativa, donde tiene lugar síntesis de RNA y de proteínas, pero no de RNA

G2: *Gap 2*: etapa post-replicativa y premitótica del ciclo celular donde se produce síntesis de RNA y proteínas

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GST: *Glutathione Transferase*

HA: hemaglutinina

KD: *Killed Death*, configuración inactivada (referido a proteínas)

kD: kilodalton(s)

Kip: *Kinase inhibitor protein* (Proteínas que se asocian a cinasas, inhibiendo las proteínas)

KRP: *Kip-related protein*, proteína de planta relacionada con Kip. Son inhibidores fisiológicos de CDKs, al asociarse al dímero CDK-ciclina

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov/

NOR: región cromosómica correspondiente al organizador nucleolar que contiene los genes del precursor ribosomal del rDNA

ORF: *Open Reading Frame*, región de lectura abierta

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la DNA polimerasa

pER8: vector de expresión en plantas

PM: marcador de masa molecular

RBR1: proteína *Retinoblastoma-related 1*, de plantas

rpm: revoluciones por minuto

RNAi: interferencia por ácido ribonucleico

RT-PCR: *reverse transcription-polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa. Detecta niveles de expresión de mRNA

S6K: cinasa S6 que fosforila la proteína S6 de la subunidad pequeña 40S del ribosoma eucariótico

SDS: dodecil sulfato sódico

SSC: solución salina citrato

T: timina

TBE: tampón tris-ácido bórico-EDTA

TE: tampón tris-EDTA

Tm: *melting temperature*, temperatura media de fusión

TNT: Tampón Tris-NaCl-Tween 20

TOR: *Target of Rapamycin*, diana de rapamicina. La rapamicina es un antibiótico que bloquea proteíncinasas que fosforilan aminoácidos (serina y treonina) de proteínas que participan en la división de las células, tales como la cinasa p70s6 (en mamíferos), S6K (en plantas) y también la ciclina C

UV: radiación ultravioleta

XVE: secuencia de DNA que codifica un factor de transcripción quimérico que contiene DNA unido a un dominio lexA (residuos 1-87)

RESUMEN

En esta tesis se estudia la función de los genes *S6K1* y *S6K2* en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia. En protoplastos obtenidos de plantas silvestres en los que la expresión de ambas S6Ks fue inhibida por RNA interferencial para *S6K1* (previa generación de una construcción inducible por β -estradiol) la disminución en cinasas S6 en G2 adelantaba a corto plazo la entrada irreversible a mitosis. Esta inducción iba acompañada por la sobre-expresión de factores de transcripción E2Fb-DPa y de las cinasas CDKA y CDKB1;1 (esta última responsable de la entrada a mitosis), a la vez que se producía un incremento en la fosforilación de histona H1.

Como la completa inhibición de la expresión de ambos genes se comportaba como letal, se utilizaron plantas mutantes heterocigotas *+/+s6k1s6k2* así como plantas en las que la expresión de ambos genes resultaba inhibida por RNA interferencial para analizar la respuesta a la disminución crónica en S6Ks. En las células en proliferación de la epidermis foliar y de yemas florales el número de ciclos transcurridos desde la iniciación de un tejido hasta su desarrollo final no se ve afectado por el nivel de S6Ks presentes en la célula. Sin embargo, la bajada en S6Ks selectivamente previene el acople del ciclo microtubular al ciclo de condensación cromosómica en mitosis. Por ello, las células con bajo contenido en S6Ks en G2 inician en G2 la variante mitótica conocida como endomitosis.

Todas las células que culminan una endomitosis incrementan su ploidía por duplicación del número de cromosomas, tal como se detectó mediante FISH con sondas específicas para centroméros totales (pALb1) y para una región paracentromérica del brazo corto del cromosoma 1 (sonda pAR21). A pesar de que las células poliploides son mayores que las diploides, las plantas con bajo contenido en S6Ks son enanas. Ello se debe a la reducción en la elongación de las células que abandonan proliferación durante su diferenciación cuando hay depleción en S6Ks.

La disminución en cinasas S6 produce también un incremento en el número de pétalos de la flor; sus anteras y silíquas presentan un desarrollo menor que las de plantas silvestres y hasta un 50% de sus semillas abortan. Los meiocitos masculinos son preferentemente 2n, es decir proceden de núcleos inicialmente tetraploides. No se observaron alteraciones en dichas meiosis.

ABSTRACT

This doctoral thesis deals with the role of the *S6K1* and *S6K2* genes in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. Protoplasts were obtained from wild type plants. In them, the expression of both genes was inhibited by RNAi for the *S6K1* gene (previous generation of a β -estradiol inducible construction). Depletion in both S6 kinases accelerated, in the short run, the entry of the G2 cells into mitosis by overexpression of transcription factors as those of the E2Fb-DPa heterodimer and also of the CDKA and CDK1;1 (this last being responsible for the G2 to mitosis transition). Simultaneously, histone H1 phosphorylation increased.

As a complete inhibition of both *S6K1* and *S6K2* genes behaved as lethal, we have isolated a double knockout mutation and RNAi silencing lines for both genes to study the response to chronic depletion in both S6Ks. In the proliferating cells of epidermal and floral meristems, the number of cycles the cells faced before differentiation were unaffected by the internal level of S6Ks. However, the decrease in these kinases selectively prevents the coupling of the microtubular to chromosomal condensation cycles taking place in mitosis. As a consequence, cells with a low content of S6Ks initiate a mitosis variant known as endomitosis.

Completion of endomitosis leads to increments in ploidy due to duplication of the chromosomal number, as detected by FISH with probes specific for both all centromeres (pALb1) and for a paracentromeric region of the short arm of chromosome1. In spite that polyploid cells are larger than diploid ones, the plants with a low content on S6Ks are dwarf. This results from an important reduction of elongation of the cells leaving proliferation during their differentiation.

Falls in S6Ks are also accompanied by an increase in petal number, while anthers and siliques display developmental failures, and roughly 50% of the seeds abort. Most of the male meiocytes proceeds from tetraploid nuclei. No meiotic alterations were observed in them.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de órganos y la morfogénesis en plantas muestra una gran plasticidad que permite la adaptación a un medio ambiente cambiante, que incluye -entre otros- cambios en luz, temperatura, nivel de nutrientes, etc. Sin embargo, los mecanismos que permiten una rápida estimulación del crecimiento en condiciones favorables, mientras que lo reprimen bajo condiciones de estrés, no se conocen bien aún (Vandenbussche y Van Der Straeten, 2004). El tamaño final de los órganos vegetales está controlado por dos procesos: la división celular en sus meristemos y el tamaño final alcanzado por las nuevas células, dentro de la etapa de elongación, cuando ya han abandonado el ciclo celular (Navarrete *et al.*, 1987; Beemster *et al.*, 2003). Un componente clave en el control de dicho crecimiento es la regulación de la biogénesis de ribosomas, no sólo porque ellos son directamente necesarios para el crecimiento, sino también porque su formación y actividad es el mayor consumidor de energía (ATP) en la célula.

Para asegurar que todos los componentes celulares hayan sido convenientemente duplicados, la biogénesis ribosomal es previa a la respuesta producida por la inducción de proliferación. Así, sólo se inicia la síntesis de los componentes del ciclo celular cuando la célula ha establecido previamente su capacidad para sintetizar proteínas. En plantas superiores, el mecanismo molecular responsable de la coordinación de crecimiento y proliferación no se conoce bien. Las células que proliferan, cuyo crecimiento se puede considerar “conservador” al limitarse a la duplicación del contenido celular total desde el principio de G1 para asegurar su reparto equitativo en telofase, al final de la mitosis y así mantener el tamaño mitótico prácticamente constante, pueden responder de forma diferente a los estímulos activadores del crecimiento final de las células en la etapa de expansión (elongación) que se produce una vez terminada la proliferación celular. Así, mientras que las células meristemáticas aceleran su división (hiperplasia), las células post-mitóticas diferenciadas lo hacen incrementando su tamaño celular (hipertrofia) (Datar *et al.*, 2000).

La estimulación de proliferación en células aún durmientes, pero cuyo destino es proliferar, tales como los blastemas, se produce de acuerdo con una secuencia fija de eventos. Así, en primer lugar cambia el patrón de condensación de su cromatina en la propia interfase, en el sentido de que ésta se vuelve más laxa o relajada (Sans y De la Torre, 1979; Sans *et al.*, 1980), de forma semejante a lo que ocurre en las células de mamíferos, donde un cambio en el patrón de condensación cromosómica también anticipa cambios en el potencial proliferante del tejido (Hittelman y Rao, 1978).

Más aún, la célula vegetal parece condicionar transiciones irreversibles a etapas posteriores del ciclo celular -tales como la iniciación de replicación de su material genético y el comienzo de la mitosis- a síntesis de proteínas que tiene lugar en las etapas previas, es decir en G1 y en G2 (González-Fernández *et al.*, 1974). Hoy sabemos que ese requerimiento es cualitativo, es decir se requiere la síntesis de proteínas específicas para cada una de dichas transiciones. Así, las ciclinas tipo D y tipo B son moléculas que se sintetizan en G1 y G2, respectivamente. Ambas tienen una vida media muy corta, porque su síntesis ocurre en puntos concretos del ciclo celular y su degradación rápida está asegurada porque llevan asociada una cola de poli-ubiquitinas. Ellas controlan el inicio de replicación y mitosis, respectivamente (Weingartner *et al.*, 2003).

1. La maquinaria que controla el ciclo celular: activadores y represores

Las ciclinas son proteínas reguladoras que se asocian a las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) para activarlas e inducir la progresión de una célula en proliferación a través de las distintas etapas del ciclo celular. Las ciclinas se clasifican en dos grupos: ciclinas específicas de G1 (llamadas ciclinas de tipo-D en mamíferos y CLNs en levaduras) y ciclinas mitóticas (llamadas tipo-A y tipo-B en eucariotas superiores y CLBs en levaduras).

A pesar del pequeño tamaño de su genoma, en *Arabidopsis thaliana* se han descrito, hasta ahora, 32 ciclinas con un papel específico en la progresión del ciclo celular: diez son ciclinas de tipo-A; once de tipo-B; diez de tipo-D, y una única ciclina

de tipo-H (Vandepoele *et al.*, 2002; Tsakrklides y Solomon, 2002; Wang *et al.*, 2004).

La variedad en los componentes mitogénicos, es decir los que activan las distintas etapas del ciclo proliferativo, se pone de manifiesto en las tablas en las que se establecen las principales CDKs (Tabla 1) y ciclinas (Tabla 2) en plantas (Inzé *et al.*, 2006).

Tabla 1: CDKs de plantas (Joubès *et al.*, 2000; Vandepoele *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2005).

Tipo	Número	Características
A	1	a) Constitutiva, con actividad restringida a G1 y G2 (Joubès <i>et al.</i> , 2000) b) PSTAIRE, ortóloga de CDK1 y 2 humanas c) G0/G1: fosforila y libera RB (Xie <i>et al.</i> , 1996) y se disocia de PCNA (Sánchez <i>et al.</i> , 2002)
B	4	a) Síntesis bajo control transcripcional en G2 (Joubès <i>et al.</i> , 2000; Magyar <i>et al.</i> , 1997) b) Dos subgrupos: B1 (PPTALRE) y B2 (PPTTLRE)
C	2	a) Regula la transcripción (Barroco <i>et al.</i> , 2003) b) PITAIRE ~ CDK9 humana (PITALRE) c) Actividad en G1/S
D	3	a) CAKs triméricas (Shimotohno <i>et al.</i> , 2003; Fabian-Marwedel <i>et al.</i> , 2002) b) Ortóloga de la CDK7 humana c) Fosforila CDKs y RNA pol II d) D;2 regula replicación
E	1	a) En alfalfa, no en <i>Arabidopsis</i> b) SPTAIRE
F	1	a) CAK monomérica b) Ortóloga de la de levaduras (Tsakrklides <i>et al.</i> , 2002) c) Sólo fosforila CDKs

Tabla 2: Ciclinas y otras subunidades de CDKs en plantas (Menges *et al.*, 2005)

	Tipo	Número	Características	Subtipos
Ciclinas	A	10	a) Presentes en S y G2 (Chaubet-Gigot, 2000) b) NLS alrededor de la “caja” c) No se degradan en anafase	A1 - A3
	B	9	a) síntesis en G2 por elemento Myb en sus promotores (Ito, 2000) b) B1 en condensación cromosómica y ciclo microtubular (Weingartner <i>et al.</i> , 2004) c) La degradación de B2 en la media profase coincide con inicio de la parte irreversible de mitosis (Weingartner <i>et al.</i> , 2003)	B1 - B3
	D	10	a) Ciclinas G1 (Soni <i>et al.</i> , 1995), aunque la D3;1 también en G2 b) G0/G1: interacción con RB c) Labilidad por secuencias PEST	D1 - D7
	H	7	a) Se ensambla con CAKs triméricas, es decir, con CDKs tipo D (Shimotohno <i>et al.</i> , 2003)	
	P	7	a) Ortóloga de la ciclina PHO80 de levaduras que controla G0/G1	
	T		a) Se asocian a CDKC para activar RNA pol II (Barroco <i>et al.</i> , 2003)	
Otras sub-unidades de CDKs	CDS	2	a) Acoplan otras moléculas a CDKs, ampliando así sus sustratos b) Esenciales para proliferación en plantas (De Veylder <i>et al.</i> , 1997)	
Inhibidores de CDKs	KRP	7	a) Inhibidores de CDKs (Ormenese <i>et al.</i> 2004) b) KRP1 y 2 en endo-replicación c) Ortólogos de p27Kip1 humana	

Los reguladores que activan la progresión de la célula a través del ciclo celular como típicamente lo hacen las ciclinas, introducen el control transcripcional en el ciclo celular, por la propiedad antes citada de que su biosíntesis depende del patrón de expresión génica que es específica de cada fase del ciclo celular y, por otra parte, por el hecho de que la estabilidad de su RNA mensajero es mínima, por contar con secuencias que las marca inexorablemente como dianas de las enzimas degradativas de la célula, principalmente por la vía de la ubiquitina.

Mientras que existe una sola CDK en levaduras, en plantas y animales existen varias, por ello el control transcripcional del ciclo celular en estos organismos superiores depende tanto de la síntesis restringidas a etapas concretas de CDKs como de ciclinas.

Superpuestos a los mecanismos anteriores que regulan de forma positiva, es decir que activan el ciclo celular y hacen progresar a la célula a través de las distintas etapas, existen otros mecanismos moleculares, tales como los responsables de la coordinación del crecimiento y de la proliferación celular, que son los que en última instancia mantienen el orden permanente y la irreversibilidad de las distintas fases del ciclo celular. Estos mecanismos se llaman rutas de chequeo y ejercen, por su parte, un control negativo sobre el ciclo celular. Estos mecanismos de chequeo son capaces de frenar transitoriamente la progresión de la célula proliferante por el ciclo, retrasando la entrada irreversible en la fase del ciclo celular que sigue a aquella en la que se produce dicho chequeo. Las rutas de chequeo aseguran que la célula no se enfrente a una transición irreversible entre fases sucesivas del ciclo celular antes de que todos los requisitos que la célula va a necesitar para realizar de forma eficaz y segura las funciones que tiene encomendada en las fases siguientes se hayan cumplido previamente. Un paradigma de estos mecanismos es el chequeo de estructura del DNA que se encuentra en G2. Éste impide que la célula inicie mitosis antes de que la célula haya completado tanto la replicación semi-conservativa que se produce en el periodo S de la interfase, como la reparación post-replicativa que tiene lugar por síntesis no conservativa de su DNA en la etapa G2, pre-mitótica. Con ello se impide que se rompa y pierda material genético cuando el DNA se vea sometido a la tensión y estiramiento

producidos por la interacción centrómero-fibras del huso mitótico que tiene lugar en anafase.

Las rutas de chequeo, en esencia, son cadenas de enzimas que transmiten señales anti-mitogénicas cuando la célula no está aún preparada para enfrentarse a una transición entre fases del ciclo celular, retrasando el momento en que se produce la transición a la etapa siguiente.

El comportamiento de las rutas de chequeo y sus componentes no se conocen tan bien como los responsables de la activación y progresión de la célula a través del ciclo, tanto en las células animales como en las de plantas superiores. Esto es principalmente debido a que el funcionamiento de las rutas de chequeo es transitorio. No sólo se interrumpen cuando el requisito que falta para permitir una transición se cumple, sino que más aún, se interrumpen también con el paso del tiempo, aunque dicho requisito no haya sido cumplido. La caducidad de los mecanismos de chequeo se debe a que dichos mecanismos se comportan como si poseyeran capacidad computacional para un juego de señales de distinto signo (mitogénicas frente a anti-mitogénicas). La respuesta de la ruta de chequeo, es el resultado final del balance de dichas señales. Por ejemplo, se puede frenar la entrada en mitosis inhibiendo la finalización de la replicación por depleción de nucleótidos inducida por hidroxurea. Pero, dado que hidroxurea no interrumpe el crecimiento de la célula, ésta se comporta como si las señales en aumento de tamaño celular por encima del tamaño mitótico hacen al final que la célula que aún no ha acabado su replicación semi-conservativa se vea abocada a iniciar indebida o precozmente la fase siguiente de la mitosis (Pelayo *et al.*, 2001). Esto se conoce como adaptación a chequeo, si bien es un término que puede llevar a engaño, porque con ello se está refiriendo sólo a una entrada indebida en una etapa concreta del ciclo celular, a falta de algún requisito importante para la eficaz culminación de la etapa subsiguiente a la que la célula está abocada.

El mecanismo por el cual las rutas de chequeo frenan la progresión del ciclo celular es por su interacción inhibitoria con el ciclo de CDK-ciclinas que lo activan. En la mayoría de los casos, la diana formal de esas rutas resultan ser los residuos treonina 14 y tirosina 15 de la CDK, impidiendo la pérdida de su fosforilación que mantiene preparado el dímero CDK-ciclina correspondiente, para su activación

instantánea por la fosfatasa Cdc25, un proceso conservado en animales y plantas. Dicha desfosforilación es realmente el gatillo que activa la entrada en la fase siguiente del ciclo celular que se encuentra controlada por la ruta de chequeo específica para esa transición a la fase siguiente del ciclo celular. Aunque no existe el gen ortólogo para la fosfatasa Cdc25 en plantas, la ciclina mitótica B1 es un candidato plausible para su sustitución, dado los motivos que ambas proteínas poseen (Boudolf *et al.*, 2006).

Para el investigador, la adaptación a chequeos por activación prematura de una CDK-ciclina temporalmente inactivada es una herramienta valiosa que permite conocer requerimientos que deben ser cumplidos para que la correspondiente ruta de chequeo permita la transición a la fase subsiguiente del ciclo celular. Por otra parte, el daño que se observa en la etapa o etapas siguientes, una vez producida la adaptación al chequeo, permite saber el porqué dicho requisito que falta a la célula es importante para la continuidad segura del ciclo celular.

2. Las proteíncinasas S6

Estas proteínas están codificadas por los genes At3g08730 y At3g08720 que se encuentran ubicados en el brazo largo del cromosoma 3 y que pertenecen a la subfamilia S6K. Fueron descritos por primera vez por Zhang *et al.* (1994 a y b) (Figura 1). La subfamilia S6K pertenece, junto a otras seis subfamilias, a la familia de genes que codifican las cinasas AGC, llamadas también proteíncinasas A dependientes de cAMP (Bögre *et al.*, 2003). Estas se caracterizan por poseer motivos catalíticos en los extremos N- y C-terminal y por poseer motivos específicos en el dominio de activación (conocido también como lazo T), que está situado entre los subdominios VII y VIII de estas cinasas.

Mizoguchi y colaboradores (1995) identificaron en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia dos proteínas homólogas a S6K, las proteíncinasas ribosomales p70 S6 (S6K): S6K1 y S6K2 (inicialmente nombradas ATPK6 y ATPK19, respectivamente). S6K2 parece ser una cinasa ortóloga de la proteína p70S6K presente en mamíferos, porque se ha demostrado que es capaz de fosforilar en ellos la proteína

ribosómica S6 (Zhang *et al.*, 1994 a y b; Turck *et al.*, 1998).

Nº del cromosoma

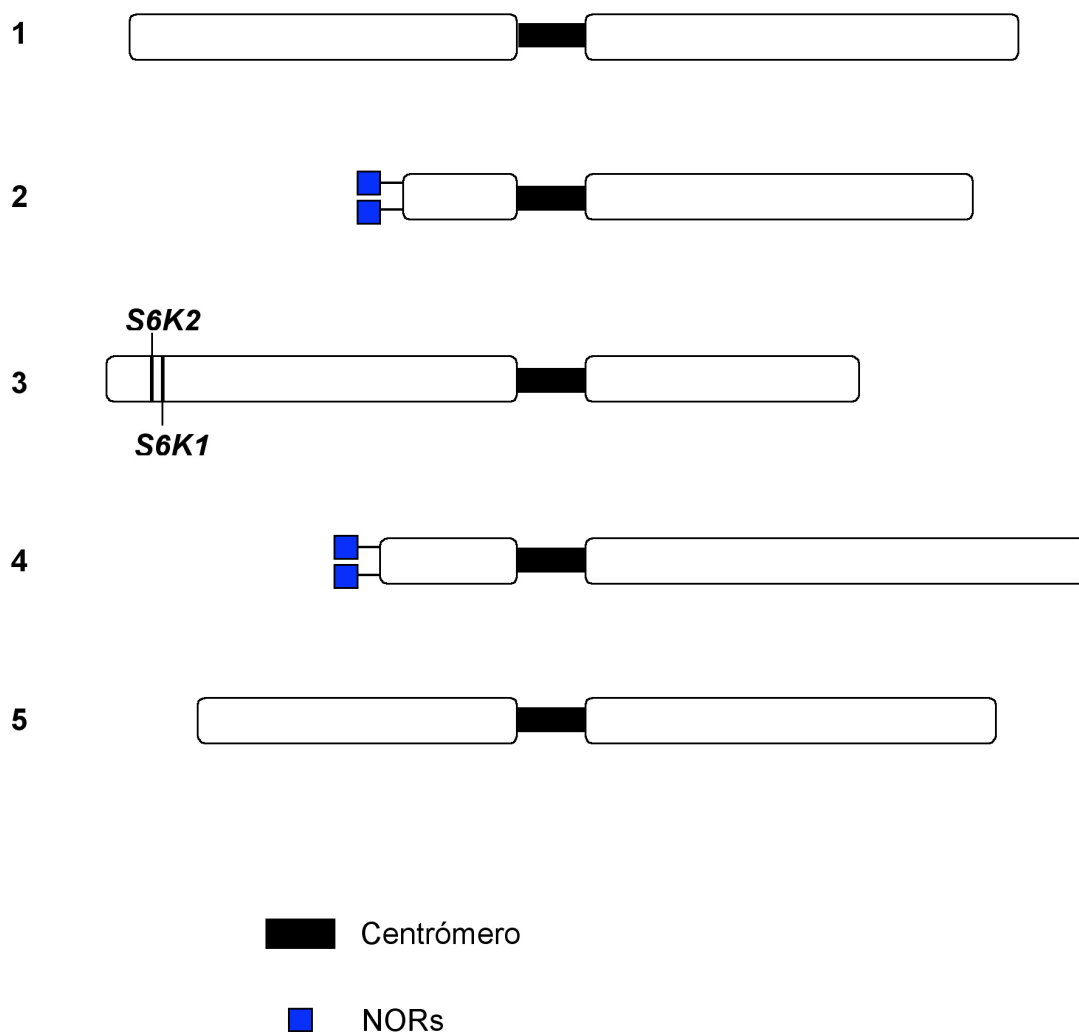


Figura 1: Idiograma de los cromosomas del complemento haploide de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, donde se muestra la localización de los genes At3g08730 (*S6K1*) y At3g0720 (*S6K2*) en el cromosoma 3. Se muestra también la localización de los centrómeros, así como las zonas de NORs, éstos últimos situados en los cromosomas 2 y 4.

En células vegetales, los niveles de transcripción de ambos genes *S6K1* y *S6K2* aumentan rápidamente cuando la planta es sometida a estrés por frío o por un aumento de la salinidad del medio. Ello aporta información sobre el papel de la fosforilación de proteínas en plantas como respuesta a estrés ambiental (Mizoguchi *et al.*, 1995). Turck y colaboradores (2004) han demostrado que la actividad de las S6Ks de plantas aumenta en presencia de auxinas y citoquinas. Se ha establecido una conexión directa entre S6K y la cinasa TOR (*Target of Rapamycin*) en plantas. Así, Mahfouz y colaboradores (2006) demostraron que la proteína RAPTOR1 interactúa *in vivo* con S6K1 de *Arabidopsis*, que a su vez es un sustrato putativo de TOR. S6K1 y S6K2 son activadas por PDK1 (Mahfouz *et al.*, 2006; Otterhag *et al.*, 2006). El dominio catalítico de S6K1 proveniente de *Nicotiana tabacum* fosforila la proteína ribosomal de *Arabidopsis* S6. El dominio catalítico de S6K1 puede ser fosforilado por la proteín-cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol en *Arabidopsis* (PDK1), lo que indica el papel que juega PDK1 en la regulación de S6K. La actividad de la proteína S6K es sensible al estrés osmótico, mientras que no modifica la actividad de PDK1.

La proteín-cinasa ribosómica S6 (S6K) es un regulador central del crecimiento en animales. S6K es capaz de integrar señales estimuladoras del crecimiento, que llegan a través de las vías de señalización TOR y PDK1, en señales emergentes promotoras del crecimiento (Wullschleger *et al.*, 2006). Las vías de señalización en animales se asocian a la traducción preferencial de proteínas ribosómicas que constituyen la maquinaria de síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento como respuesta (Kozma y Thomas, 2002).

En células de ratón, cuando todos los sitios diana de fosforilación de S6K han sido mutados en RPS6, el tamaño celular sufre una importante reducción, pero la síntesis de proteínas no es inhibida, indicando que S6K puede regular positivamente la traducción de proteínas a través de sus otras dianas, tales como eIF4B (Ruvinsky *et al.*, 2005; Ruvinsky y Meyuhas, 2006; Shahbazian *et al.*, 2006). Por otra parte, en células en proliferación, el tamaño mitótico y, por ello, el tamaño medio de las células es un parámetro que, cuando se mantiene la tasa de síntesis de proteínas, resulta directamente proporcional al tiempo que la célula ha permanecido creciendo en la etapa interfásica previa. Es decir, a mayor tiempo en interfase o, al menos, en G2, mayor tamaño celular mitótico y mayor tamaño medio alcanzado por la población celular. La

duración G2 se alarga como consecuencia de la aparición de rutas de chequeo. Así, por ejemplo, a más daño en el DNA de la célula en G2, mayor será el tiempo que la célula pase en G2 y, dado que el crecimiento es continuo del principio de G1 o final de la mitosis, las células alcanzarán un tamaño mitótico mayor. Ello concluye en la presencia de células de mayor tamaño que las células que crecen en ausencia de estrés.

En *Arabidopsis*, las cinasas S6 (AtS6K1 y AtS6K2) están codificadas por dos genes estructurales similares que se encuentran próximos entre sí. Cuando es introducido en células humanas el gen S6K2 puede ser activado por insulina, lo cual sugiere la existencia de un sistema conservado de regulación en animales y plantas (Turck *et al.*, 1998). Además, AtS6K2 es dependiente de la ruta de señalización que es sensible a los inhibidores de la cinasa 3-fosfoinositol (PI3-kinase) (Turck *et al.*, 2004). En plantas, la fosforilación de la proteína ribosómica S6 es activada por las fitohormonas auxina y citoquinina, mientras que condiciones de estrés tales como calor u estrés oxidativo inhiben su actividad (Williams *et al.*, 2003; Turck *et al.* 2004, Mahfouz *et al.*, 2006).

El crecimiento en plantas es regulado en sus meristemas por la coordinación espacial y temporal de la división y diferenciación celular. De acuerdo a datos recientes la ruta metabólica RB/E2F (proteína de chequeo retinoblastoma y factor de transcripción E2F) podría regular estos eventos (Du y Pogoriler, 2006; Fleming, 2006; Inzé y De Veylder, 2006; Timmers *et al.*, 2007). La familia E2F de factores de transcripción controla la expresión de varios genes involucrados en la proliferación celular. Por otro lado, la familia de proteínas RB inhibe la activación transcripcional de E2Fs y reprime globalmente los promotores por medio del reclutamiento de enzimas remodeladoras de la cromatina (Du y Pogoriler, 2006). En *Arabidopsis*, *RBR1* es el único homólogo del gen humano *Retinoblastoma* (*Rb*), mientras que existen tres genes relacionados con *E2F* que realizan diferentes funciones. Mientras que *E2Fc* es un represor transcripcional (Del Pozo *et al.*, 2006), *E2Fa* y *E2Fb* son activadores (De Veylder *et al.*, 2002; Magyar *et al.*, 2005). Es muy probable que RBR1 regule las tres proteínas E2Fs, y que las formas que forman complejo con RBR1 o las formas libres de E2F controlen en plantas el ciclo celular y la diferenciación, a través de mecanismos aún desconocidos.

El ciclo celular normal se caracteriza por una ronda de replicación del DNA (fase S), dos fases interfásicas no replicativas: G1 (pre-replicativa) y G2 (post-replicativa), seguida esta última por mitosis y citocinesis (fase M). Sin embargo, muchas plantas tienen un ciclo celular distinto, llamado endo-replicación, con replicaciones iterativas del DNA sin mitosis ni división citoplasmática. Esta endo-replicación se observa frecuentemente en algunas plantas, y el nivel de ploidía alcanzado varía entre especies y tejidos. En *Arabidopsis*, se detectan núcleos con más de 32C en los tricomas de las hojas. Estos núcleos son politénicos, resultado directo de los ciclos G1-S-G1-S (Galbraith *et al.*, 1991). También hay células del endospermo de maíz que pueden alcanzar un contenido de DNA de 96C ó 192C (Knowles *et al.*, 1985; Leiva-Neto *et al.*, 2004). El papel fisiológico de la endo-replicación está en discusión, siendo varias las hipótesis propuestas. Éste juega probablemente un papel importante en procesos de diferenciación. La inducción de politenía se produce durante la elongación del hipocotiledón, durante el crecimiento del tricoma, y también en el desarrollo de frutos y hojas. Además, las especies de plantas que endo-repican tienen a menudo un ciclo de vida corto, paralelo a un desarrollo rápido (Barow y Meister, 2003). Se pensó durante mucho tiempo que la endo-replicación era esencial para sostener el crecimiento celular y para mantener un balance óptimo entre el volumen celular y el DNA nuclear (Folkers *et al.*, 1997; Hulskamp *et al.*, 1994; Hulskamp *et al.*, 1999; Melarangno *et al.*, 1993; Traas *et al.*, 1998), pero este concepto ha sido abandonado (Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003).

3. La ruta del complejo RBR/E2F/DP

Plantas y animales comparten la misma ruta RBR/E2F/DP (*dimerization partner*, DP) para controlar la transición desde la fase G1 a fase S (de síntesis del DNA) del ciclo celular. En ambos casos, las proteínas del retinoblastoma (RB) interactúan con el complejo E2F/DP para inhibir la transcripción de los genes regulados por E2F. Incluso la secuencia original de DNA (TTTCCCGC) reconocida por los factores de transcripción es idéntica en animales y en plantas. Esto es un argumento a favor de la hipótesis que propone que la ruta RB/E2F/DP ha evolucionado en organismos primitivos, antes de la separación de las dos *taxa* de animales y plantas. Mientras

Arabidopsis codifica varias CDKs, ciclinas y KRPs (*Kip-related proteins*), su genoma contiene sólo un gen relacionado con RB (RBR1). Todas las RBR de plantas presentan, al igual que las de animales, dos bloques de secuencias conservadas que forman el llamado dominio bolsillo A/B que es el lugar de unión de los factores de transcripción E2F. En plantas, las proteínas RBR interactúan con la ciclina D a través del motivo conservado LxCxE en el extremo N terminal de este último (Ach *et al.*, 1997; Dahl *et al.*, 1995; Huntley *et al.*, 1998; Nakagami *et al.*, 2002; Nagakami *et al.*, 1999; Soni *et al.*, 1995). Las proteínas RBR se asocian a complejos de ciclinas que contienen CDKA y ciclina D, y que por ello se expresan en la fase G1 del ciclo celular. Pero RBR no sólo se encuentra asociada a la fase G1, sino que también se encuentra presente en células que se encuentran en la fase G2 tardía, antes de llegar al punto de chequeo G2/M, al menos en células animales (Sung *et al.*, 2007; Blais *et al.*, 2007). En células de tabaco, el complejo CycD3;3/CDKA fosforila RBR durante la etapa media de la fase G1 hasta la fase S temprana, y la fosforilación de la histona H1 por este mismo complejo se ve incrementada tanto en el paso de la fase G1 a S como en el paso de G2/M a la fase M (Nakagami *et al.*, 2002). Usando como modelo de regulación por RBR1 del ciclo en respuesta a ayuno de sacarosa, las células de *Arabidopsis thaliana* cuando se hace disminuir la cantidad de la proteína de chequeo RBR1 se observa que las células en lugar de resultar bloqueadas en la transición de G1 a S, lo hacen de G2 a mitosis (Hirano *et al.*, 2008). Ello produce acumulación de células en G2 con la activación correspondiente de proteínas que son marcadoras de genes que se expresan en esa etapa de la interfase tardía, tales como la cinasa dependiente de ciclina CDKB1;1 que promueve la transición de G2 a mitosis.

En este trabajo demostramos que la carencia simultánea de AtS6K1 y AtS6K2 no es viable para el desarrollo de *Arabidopsis*. AtS6K1 regula negativamente la proliferación celular, es decir se comporta como una proteína de chequeo, coordinando distintos procesos del ciclo celular. La disminución en el contenido de las cinasas S6K1 y S6K2 durante G2 induce endomitosis y, como consecuencia, provoca la formación de células poliploides que inician su nuevo ciclo con un número doble de cromosomas que la célula G2 que le dio origen.

OBJETIVOS

El objetivo final de esta tesis es conocer el papel de las cinasas S6Ks (codificadas por los genes *AtS6K1* y *AtS6K2*) en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, especialmente en la regulación de proteínas reguladoras del ciclo celular.

En base a lo anterior se establecieron los siguientes objetivos:

1. Obtención de plantas de en las que la expresión de los genes *S6K1* y *S6K2* se inhibe mediante la inserción de RNA interferencial (RNAi), previa generación de una construcción inducible con β -estradiol.
2. Estudio del fenotipo de plantas con niveles de S6Ks inferiores a los normales. Evaluación del crecimiento celular y cambios en el tamaño final de hojas y en sus células.
3. Obtención de sondas para regiones cromosómicas para la determinación del nivel de ploidía, mediante hibridación *in situ* con sonda fluorescente (FISH) en núcleos interfásicos, tanto en plantas de líneas mutantes para los genes *S6K* como en plantas en las que la expresión de las cinasas S6 ha sido silenciada por RNAi.
4. Estimación del nivel de ploidía de células somáticas de plantas de tipo silvestre, de plantas de la línea heterocigota *+/+s6k1s6k2* y de plantas *S6K1*(XVE-RNAi) en las que la expresión de las cinasas S6 ha sido reducida, mediante cuantificación de cromocentros y de centrómeros. Para ello utilizaremos la tinción preferente de cromocentros (DAPI) y la técnica de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) con sondas, tales como la pAL1b que detecta los centrómeros de todos los cromosomas, y la pAR21 que detecta preferentemente la zona paracentromérica del brazo corto de los cromosomas 1.

5. Estudio, en protoplastos, de plantas WT y de plantas con niveles bajos de cinasas S6 de la presencia de proteínas tales como E2Fb y DPa que forman el heterodímero que actúa como factor de transcripción y de las proteínas CDKA y CDKB1;1 que controlan la entrada en mitosis.

6. Fertilidad y meiosis en el gameto masculino frente a la reducción de cinasas S6.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ecotipo de *Arabidopsis thaliana*

El ecotipo de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) empleado en este trabajo fue Columbia (Col-0), procedente del Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC) (<http://nasc.nott.ac.uk>), con número de acceso N 907, cuyo desarrollo se muestra en la figura 2.

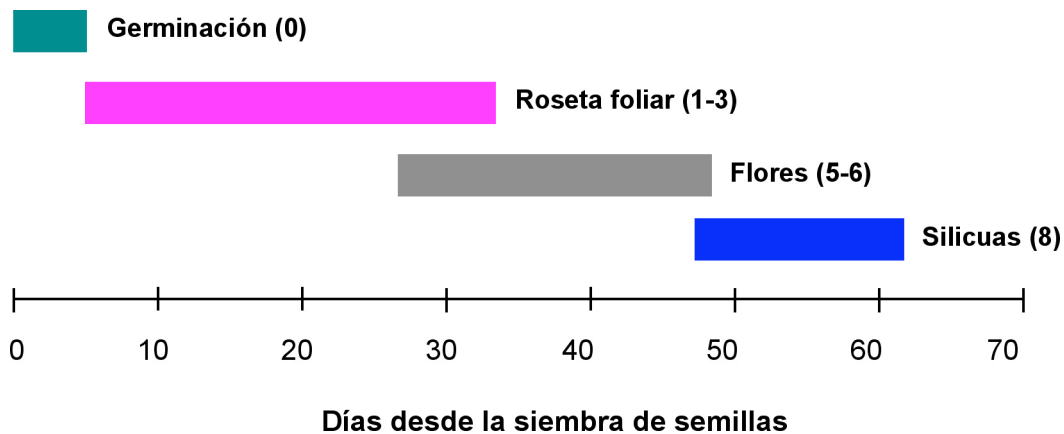


Figura 2: Esquema cronológico de las principales etapas de desarrollo en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, de tipo silvestre (WT). Los números entre paréntesis corresponden a los principales estados de desarrollo descritos para esta especie (Lancashire *et al.*, 1991; Boyes *et al.*, 2001).

2. Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Los cultivos de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia se obtienen a partir de semillas sembradas en una cámara de flujo laminar en placas Petri, con medio Murashige and Skoog (MS) (Sigma-Aldrich). Las semillas se desinfectaron previamente durante 10 minutos en una solución de lejía 30% (v/v), Tritón X-100 0,2% (v/v). Luego se lavaron en agua destilada estéril. Pasadas dos semanas de desarrollo, cuando las plantas ya tenían 4 hojas, se traspasaron a alveolos con una mezcla de tierra fertilizada y vermiculita, en proporción 3:1 (v/v). Las placas Petri y los alveolos se incubaron en una cámara de cultivo a 20°C, con una humedad relativa de 60%, bajo un régimen de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

3. Construcciones

Los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo para realizar las construcciones se muestran en la tabla 1. La región de lectura abierta (ORF) del gen *S6K1* (At3g08730) (Figura 3) se amplificó por PCR, se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, USA), se secuenció, se digirió con la enzima *NcoI/EcoR1* y se clonó en el vector pENTR4 GatewayTM. Se insertó un marcador HA triple en el sitio *NotI* introducido en el extremo C-terminal del gen *S6K1*. Un vector inducible por β -estradiol (Zuo *et al.*, 2000) compatible con el sistema GatewayTM fue cedido por B. Ulker, Colonia. Este vector se usó para generar la construcción *pER8::S6K1-3xHA*, que nombraremos desde ahora *XVE::S6K1-HA*. La tecnología GatewayTM se usó también para generar la construcción del RNA de interferencia inducible por β -estradiol: *pER8-RNAi::S6K1*, que nombraremos *S6K1(XVE-RNAi)*. *XVE::S6K1-HA* junto con el vector vacío (XVE), *S6K1(XVE-RNAi)* (Figura 4) y el vector vacío (XVE-RNAi) fueron transfectados en la cepa GV3101pMp90 de *Agrobacterium*. Las colonias que dieron un resultado positivo fueron confirmadas por PCR con oligonucleótidos específicos para S6K1. Para realizar la transfección de los protoplastos, la construcción *S6K1-HA* GatewayTM se insertó en el vector pK2GW7 (Karimi *et al.*, 2002). La presencia de *S6K1-HA* en el vector fue confirmada por secuenciación. Para la expresión constitutiva

del RNA de interferencia de *S6K1* (RNAi), la región de lectura abierta (ORF) del gen *S6K1* se insertó en el vector pJawhol8-RNAi compatible con GatewayTM proporcionado por B. Ulker. Estas construcciones se utilizaron específicamente para experimentos de transfección en protoplastos. Las construcciones RNAi se realizaron usando la región de lectura abierta (ORF) del gen *E2Fb* y la región del sitio activo de *RBR1* (aminoácidos 407-1013) en el vector pK7GWIWG2(I) (Karimi *et al.*, 2002). *pRT100::S6K1-GFP* y *pRT100::S6K1-KD-HA* (cinasa S6K1 inactiva en la Lys 163, responsable de la coordinación de la fosforilación en el sitio activo, fue reemplazada por Arg) fueron cedidos por el Dr. M. Teige, Viena, y su secuencia se confirmó por secuenciación. Las regiones codificantes RBR1 de *RBR1-GFP* (Magyar *et al.*, 2005) se clonaron en el vector pK7FWG2 GatewayTM. La región de lectura abierta (ORF) de *CycD3;1* se amplificó por PCR y se clonó en el vector pSK (Stratagene, USA) en marco con un epítotope HA en el extremo N-terminal (Magyar *et al.*, 2005), se insertó en el vector pDON-201 (Invitrogene, USA, CA) y finalmente se insertó en el vector pK7WG2D GatewayTM (Karimi *et al.*, 2002). Para la construcción del centro activo *RBR1*-GST, se amplificó el dominio como se describió anteriormente para la construcción GFP, y se clonó en el vector de fusión GST pGex-4T-3 (GE Healthcare, UK).

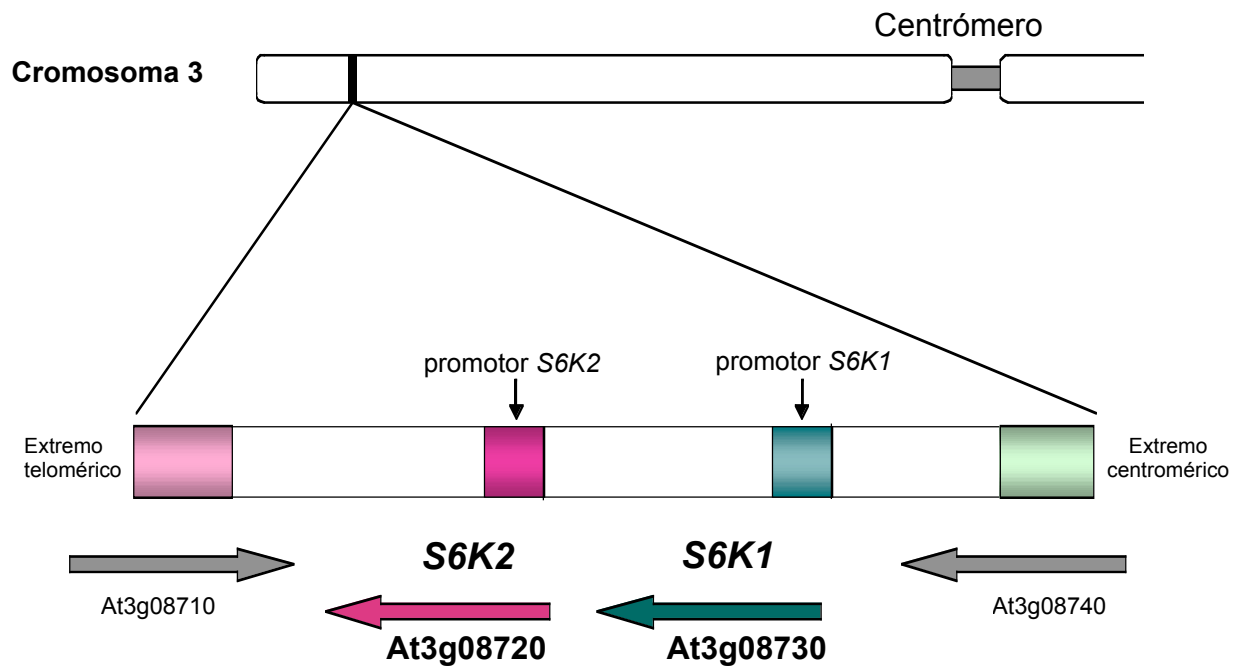
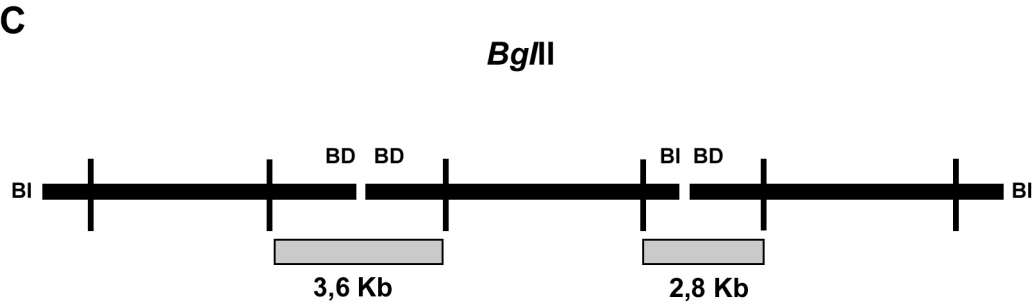
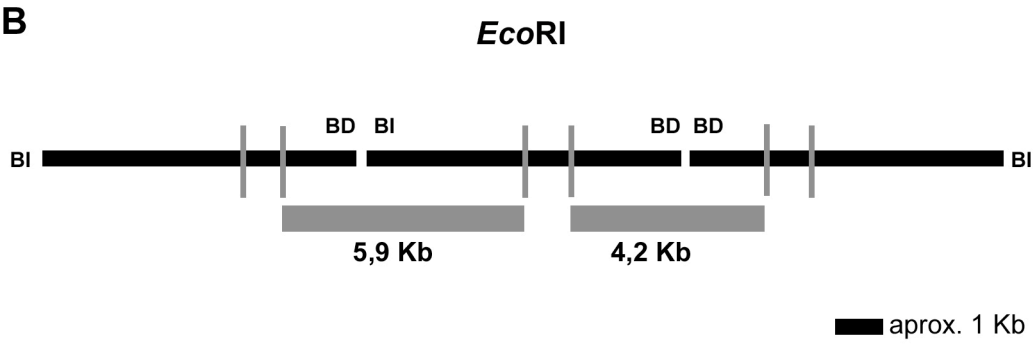
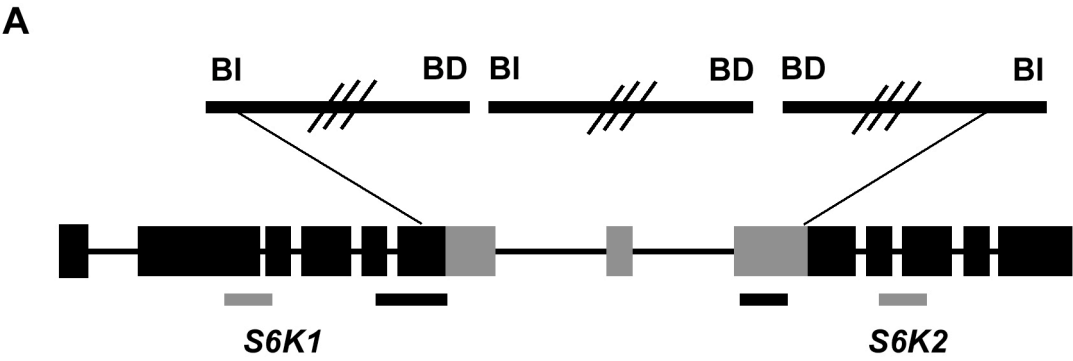


Figura 3: Esquema de ubicación de los genes *AtS6K1* y *AtS6K2* en el brazo largo del cromosoma 3. Las flechas inferiores indican la dirección de transcripción.

FIGURA 4: (A) Mapa esquemático de la inserción de T-DNA en la línea de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2*. Tres copias de T-DNA insertadas entre *S6K1* y *S6K2* deletan el último exón de *S6K1* y los dos primeros exones del gen *S6K2*. (B) Representación esquemática de la localización y de los tamaños de los fragmentos digeridos por las enzimas *EcoRI* y (C) *BglII* detectados por *Southern blot* en plantas *+/s6k1s6k2*. (D) Detalle de las secuencias genómicas de los genes *S6K1* y *S6K2* en el sitio de inserción del T-DNA. Las letras minúsculas en negrita representan a los intrones, las letras mayúsculas en negrita corresponden a las secuencias de exones. Las letras minúsculas y mayúsculas en cursiva corresponden a las secuencias de intrones y exones que han sido eliminadas, respectivamente.



D

tagCTGCTGCAAAAAGAGCCAGAAAGGCGACTTGGAAAGTGGACTGAGCGGAGCAGAGGAG	2880	At3g08730 S6K1
ATAAACAGCACAAATGGTTCAAGGGAATAAAGCTGGAAGAAGCTGGAGGCTAGAGAAGTG	2940	exon 6
ATGCCAAGTTTCAAGCCGGAAGTATCGGGAAGGCAATGCATAGCAAATTTGACAAGTGT	3000	
TGGACTGACATGTCTGTTTTGGATTCTCCGGCGAGCAGTCCCAGTTCGGATCCTAAGGCC	3060	
AACCCTTTTACCAATTTCACTTACGTCAGGCCTCCTCCTTCATTCTTCACCAAGTCCACA	3120	
ACTACTTTGTAGatttactatattttatgttagtctactcttgggtgtgttctt	3180	
.....TACGCGATGAAGGTCATGAGAAAAGATAAAATTGTTGAGAAGAATCATGCTGAATACATG	4860	At3g08720 S6K2
AAAGCCGAGCGCATATTCTAACC AAAATCGATCATCCTTTCATTGTGCAACTTAAATAC	4920	exon 2
TCTTTTCAGgtaaaagccaacttctctgttgcctcattgttttctcaagtact.....	4980	

4. Generación de plantas transgénicas

Se infiltraron al vacío plantas de *Arabidopsis* (Col-0) con la construcción *S6KI*(XVE-RNAi), y posteriormente se seleccionaron con el antibiótico higromicina B a una concentración de 15 ng/mL. Las plantas transgénicas presentaban tricomas con un número mayor de ramas. En base a este criterio, se identificaron tres líneas independientes (2, 3 y 6) que llevaban una inserción simple de la construcción. Estas líneas se autofecundaron y posteriormente se analizó la generación T2 de plantas hemicigotas. Se aisló la línea *++/s6k1s6k2* mutada por inserción de un T-DNA de la colección de Prof. C. Koncz (Szabados *et al.*, 2002). Las plántulas que llevaban la construcción se seleccionaron en medio MS con higromicina B 15 ng/mL y se cultivaron en condiciones de día corto (8 h luz/16 h oscuridad), durante 4 semanas. Luego, las plantas se transfirieron a una mezcla de tierra: vermiculita 3:1 (v/v) y se cultivaron en condiciones de día largo (16h luz/8h oscuridad). El análisis del genotipo se realizó siguiendo el método utilizado por Henriques (2002). Para el análisis de las líneas inducibles, las plantas se cultivaron en ausencia (-) o en presencia (+) del inductor β -estradiol 5 μ M de la construcción.

5. Extracción de DNA genómico a partir de hojas de *A. thaliana*

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 2 g de material vegetal (hojas), previamente congelado en N₂ líquido que se pulverizó a continuación en un mortero. Se añadió tampón de extracción Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM, pH 7,0 y SDS 1% (p/v) y se homogenizó la mezcla. Posteriormente, se centrifugó a 15.000 g durante 5 minutos, recuperándose el sobrenadante. A éste se añadió un volumen de fenol (pH 8,0), se homogenizó la mezcla con ayuda de un vórtex durante 10 segundos, se centrifugó a 15.000 g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Al sobrenadante se le añadió un volumen de cloroformo: isoamilalcohol 24:1 (v/v), se mezcló invirtiendo el tubo y se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante.

Finalmente se añadió al sobrenadante 1/10 de su volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y se precipitó el DNA con 0,6 volúmenes de isopropanol, durante 10 minutos a temperatura ambiente o con dos volúmenes de etanol absoluto (Merck) previamente enfriado a -20°C, durante un tiempo entre 3 y 24 horas. Posteriormente, se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el *pellet* que contiene el DNA precipitado se lavó con etanol al 70% durante 5 minutos. Luego, se centrifugó durante 5 minutos a 15.000 g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se secó el *pellet* de DNA y se resuspendió en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM), pH 8,0. El DNA se trató durante 12 horas con RNAsa (sin DNAsa) 80 ng/mM a 37°C. A continuación, se cuantificó el DNA en un espectrofotómetro Biophotometer V1.26 (Eppendorf) y posteriormente se almacenó a -20°C hasta su utilización.

6. Obtención de sondas para hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para realizar la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se buscaron zonas del genoma de *Arabidopsis thaliana* repetidas, que se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y luego se marcaron para su posterior utilización.

6.1. Amplificación de secuencias por PCR

Se realizó la amplificación de las secuencias de *A. thaliana* a partir de una pareja de oligonucleótidos que actúa como iniciador para amplificar el producto deseado. La búsqueda de secuencias en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih) se realizó con el fin de diseñar los oligonucleótidos que iban a ser usados para amplificar dichas secuencias por PCR, y emplearlas como sondas en FISH. Estas secuencias corresponden a los genes *AL1b* y *AR21*. Se usó el programa *Primer Select* de DNASTAR que selecciona la mejor pareja de iniciadores de PCR de forma que las temperaturas a las que se produce la fusión de secuencias complementarias T_m de los oligonucleótidos se encontraran entre 55°C y 65°C, que corresponden aproximadamente a una longitud de 24 bases. En los casos en

que era necesario aumentar la especificidad de la reacción, se incrementó la temperatura de fusión (T_m) hasta 70°C, temperatura que corresponde a longitudes de oligonucleótidos de hasta 30 bases. La diferencia existente entre las temperaturas de fusión (T_m) de cada par de oligonucleótidos fue inferior a 5°C y el porcentaje de G+C (Guanina + Citosina) en los oligonucleótidos fue superior al 40%. Una vez seleccionados, los cebadores que se muestran a continuación fueron enviados a sintetizar.

La secuencia pAL1b se amplificó con la pareja de oligonucleótidos 5'-ATACGTTCTTCTTGCTTCTCAAAGCGTTCA-3' y 5'-AGTGTTTTGGAGTCGAATATGACTTGATCGC-3', a 55°C, obteniéndose un fragmento en torno a 124 pb.

La secuencia pAR21 se amplificó con la pareja de oligonucleótidos 5'-AGATCTTAGGAGTTTTTGGTCTTGAATCGTAT-3' y 5'-GTATCATTGAGCATAAGAACTAGAATCGCAACC-3', a 57,5°C, obteniéndose un producto de 415 pb.

6.2. Marcado de sondas por PCR

Utilizando los oligonucleótidos descritos anteriormente, se amplificaron las secuencias de DNA mediante PCR. La PCR se realizó usando 0,6 μ M de cada cebador, mezcla de dNTP 0,2 mM, 1 unidad de la enzima Taq DNA Polimerasa (Amersham Biosciences), tampón de la enzima 1x, Cl_2Mg 1,5 mM y DNA de hoja de *A. thaliana* ecotipo Columbia a concentración de 1 ng/ μ L. El producto de PCR obtenido se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-borato (TBE) (0,5x: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). Una vez obtenidos los fragmentos de DNA de las secuencias elegidas, éstos se marcaron por PCR, en la que uno de los nucleótidos, el dTTP, estaba formado por una mezcla del nucleótido normal y del marcado por digoxigenina-11-dUTP (Roche) o biotina-16-dUTP (Roche). La PCR se realizó usando 0,3 μ M de cada partidor, 0,03 mM de digoxigenina-11-dUTP o de biotina-16-dUTP, 5 mM de la mezcla de dNTPs, 1x Buffer, 1,5 mM de Cl_2Mg , 1 unidad de la enzima Taq

DNA Polimerasa (Amersham Biosciences), 1 ng/ μ l de ADN de hoja de *A. thaliana*. Estas sondas se utilizaron para detectar, mediante ensayos de hibridación *in situ* (FISH), zonas de heterocromatina específicas en *A. thaliana*.

6.3. Marcado de sondas por cebado al azar (*Random Priming*)

Las sondas amplificadas se marcaron además por el método de cebado al azar, conocido como *Random Priming*. Se marcó 1,5 μ g de cada sonda amplificada con dos unidades de la enzima Klenow, DNA polimerasa I sin exonucleasa (Amersham Biosciences), tampón de la enzima 1x, mezcla de nucleótidos dNTPs (dATP, dGTP, dCTP) 250 μ M cada uno, dTTP 25 μ M, digoxigenina-11-dUTP (Roche) o biotina-16-dUTP (Roche) 25 μ M. La proporción timina: digoxigenina o timina: biotina usada fue 1:9.

El DNA molde correspondiente a cada sonda se disolvió en agua bidestilada y se desnaturalizó a 94°C durante tres minutos, se añadió el resto de los componentes de la reacción y finalmente cada sonda se incubó a 37°C durante 3 horas.

Una vez marcadas, las sondas se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) a -20°C durante toda la noche. Al finalizar el tiempo de incubación, las sondas se centrifugaron a 4°C durante una hora, a 15.000 g. Una vez eliminado el sobrenadante, las sondas se secaron, se resuspendieron en tampón TE (pH 8,0) y se almacenaron a -20°C hasta su utilización en FISH.

7. Análisis de las plantas

Se recolectaron silicuas de todas las líneas, que posteriormente se diseccionaron bajo una lupa Nikon SMZ1500 para determinar el número de semillas abortadas y viables. El polen maduro se analizó usando la tinción Alexander, de acuerdo

a Ebel *et al.* (2004). El desarrollo de los megagametofitos y de los embriones se observó en sus flores durante diferentes estados (flores cerradas, flores abiertas con el estigma aún no visible y flores maduras con estigma de diferentes tamaños que podían estar formados por el embrión desde el estado globular hasta el estado de cotiledón) después del tratamiento con ácido clorhídrico (Ebel *et al.*, 2004). Estos análisis se realizaron en un microscopio óptico Nikon Biophot equipado con contraste de fases diferencial (DIC). Las imágenes se tomaron con una cámara Nikon Digital DXM1200 y luego se procesaron con el programa Adobe Photoshop 7,0. Las muestras de hojas y de pétalos para microscopía electrónica de barrido se prepararon según Bozzola y Russel (1990). Las micrografías electrónicas se obtuvieron en un Microscopio Electrónico de Barrido H3000N (Hitachi High Technologies) a 20 KV con un detector de electrones de barrido (*SE detector*). Las micrografías electrónicas de barrido de células de pétalos y de epidermis de hoja, de plantas en estados de desarrollo similares, se usaron para medir el tamaño de las células y para determinar el número de células. Para calcular el número de células, se contaron 10 áreas distintas de la tercera hoja (día 30) y de pétalos en un mínimo de 3 plantas por línea. Las mediciones de tamaño celular se realizaron usando la herramienta de cálculo de área del programa Image J. El tamaño de hojas y pétalos se determinó a partir de imágenes tomadas a través de un microscopio binocular (Nikon SMZ1500) con una cámara digital Nikon DMX1200. Los tricomas se contaron en células de hojas enteras y sus frecuencias se usaron para calcular su porcentaje de distribución.

8. Análisis citológico

Se fijaron yemas florales y hojas de todas las líneas estudiadas en una solución fresca de 3:1 (v/v) etanol: ácido acético y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis. Las muestras se hidrolizaron con HCl 0,1 N a 37°C durante 2 a 5 minutos, se aplastaron en un porta-objetos en una solución de ácido acético al 45% (v/v). Después de retirar el cubre-objetos, las preparaciones se tiñeron durante 10 minutos con 2,5 ng/μL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), en oscuridad.

8.1. Cuantificación del número de cromocentros en células en interfase

Se realizó la cuantificación del número de cromocentros en los núcleos en interfase de *A. thaliana* ecotipo Columbia en plantas de tipo silvestre (WT, *Wild Type*), así como en plantas en las que la expresión de las cinasas S6 (S6K1 y S6K2) había sido abolida por la aplicación de los correspondientes RNA de interferencia. Las medidas se realizaron tanto en células de hoja como en yemas florales, fijadas en etanol:ácido acético 3:1 (v/v). Una vez aplastadas y separado el cubreobjetos por inmersión en nitrógeno líquido, se tiñeron en DAPI 2,5 ng/μL, durante 10 minutos. Se lavaron en agua y se montaron en Vectashield. Se cuantificó el número de cromocentros presentes mediante la observación de los núcleos en interfase en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot. Las células seleccionadas se fotografiaron con una cámara CCD Cool Snap. Se utilizó el programa Adobe Photoshop 7,0 para la edición de las imágenes.

8.2. Análisis por citometría de flujo

Se recolectaron plantas de dos semanas de desarrollo de las líneas estudiadas. Se cortaron las dos primeras hojas de estas plantas y se mezclaron con solución tampón de extracción de núcleos del kit CyStain UV Precise P (Partec) (Magyar *et al.*, 2005). Una vez extraídos los núcleos, éstos se tiñeron con DAPI. Los datos de citometría de flujo se obtuvieron usando un sistema de análisis de partículas Partec PAS2 (Partec, Germany).

8.3. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Las sondas pAL1b (Martínez-Zapater *et al.*, 1986) y pAR21 (Simoens *et al.*, 1988) se marcaron con digoxigenina y biotina respectivamente, y se usaron para la detección de las regiones centroméricas (pAL1b) de todos los cromosomas y las para-centroméricas de los cromosomas 1 (pAR21) (Figura 5). Las muestras se prepararon y

se usaron para FISH de acuerdo a Fransz *et al.* (1998). El tratamiento pre-hibridación se inició con una incubación en RNasa libre de DNasa (Boehringer Mannheim Biochemica) a una concentración de 200 ng/μl, en 2x SSC (NaCl 0,3 M, citrato de sodio•2 H₂O 0,03 M), en cámara húmeda a 37°C, durante 1 h 30 minutos. Posteriormente, las preparaciones se lavaron dos veces en una solución 2x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente, y una vez más durante 10 minutos a 37°C. Luego, se trataron con pepsina 10 mM, HCl 0,1% (v/v) a 37°C, durante 10 minutos. Al finalizar dicha digestión, se lavaron las preparaciones dos veces en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, pH 7,3) a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Se fijaron después, durante 10 minutos, en una solución de formaldehído al 1% (v/v) en PBS, MgCl 50 mM, a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en 1x PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y se deshidrataron pasándolas sucesivamente por una serie de baños de etanol al 70%, 90% y 100%, durante 5 minutos en cada baño, a temperatura ambiente, y se dejaron secar al aire.

La concentración óptima de una determinada sonda se determinó en forma individual y combinada con otras sondas. La mezcla de sondas usadas para detección de regiones centroméricas e identificación de la región para-centromérica del brazo corto del cromosoma 1 corresponde a las sondas pAL1b-biotina y pAR21-digoxigenina. Las sondas pAL1b y pAR21 se usaron a una concentración 10 ng/μL. Se desnaturalizaron en una solución de formamida desionizada (Sigma-Aldrich) 50% (v/v), 2x SSC, sulfato de dextrano 4% (v/v), a 80°C durante 8 minutos en un termociclador (Techne-Progene). Al finalizar el tiempo de desnaturalización, las sondas se mantuvieron a 4°C. Al mismo tiempo, las preparaciones se sometieron a desnaturalización en la siguiente solución: 70% formamida desionizada (Sigma-Aldrich), 2x SSC, en agua ultra pura, a 65°C durante 4 minutos 30 segundos y se deshidrataron pasándolas por una serie progresiva de dilución de etanol 70%, 90% y 100% a -20 °C, durante 3 minutos en cada uno.

Las preparaciones se incubaron en una cámara húmeda a 37°C, durante 12 horas, para su hibridación en 12 μl de la sonda ya desnaturalizada. Luego se lavaron en los baños post-hibridación: dos lavados en solución tampón 2x SSC a 37°C, y un lavado en 1x SSC a 65°C, durante 5 minutos cada uno. Después, dos lavados en TNT Tris-HCl 0,1 M pH 7,6; NaCl 0,15 M y Tween-20 0,05% (v/v) a temperatura

ambiente, durante 5 minutos. Las preparaciones se incubaron en una solución de bloqueo TNB Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5; NaCl 0,15 M y reactivo de bloqueo 0,5% (p/v) (Roche) a 37°C, durante 20 minutos. Entonces se lavaron en un baño de TNT para luego incubarlas en presencia del anticuerpo conjugado al fluorocromo FITC anti-digoxigenina-fluoresceína o anti-digoxigenina-rodamina (Boehringer Mannheim Biochemica) en cámara húmeda a 37°C, durante 45 minutos, en oscuridad. Posteriormente las preparaciones se lavaron dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en TNT y luego se deshidrataron en una serie de etanol: 70%, 90% y 100%, a temperatura ambiente en oscuridad, durante 3 minutos en cada uno.

Nº del cromosoma

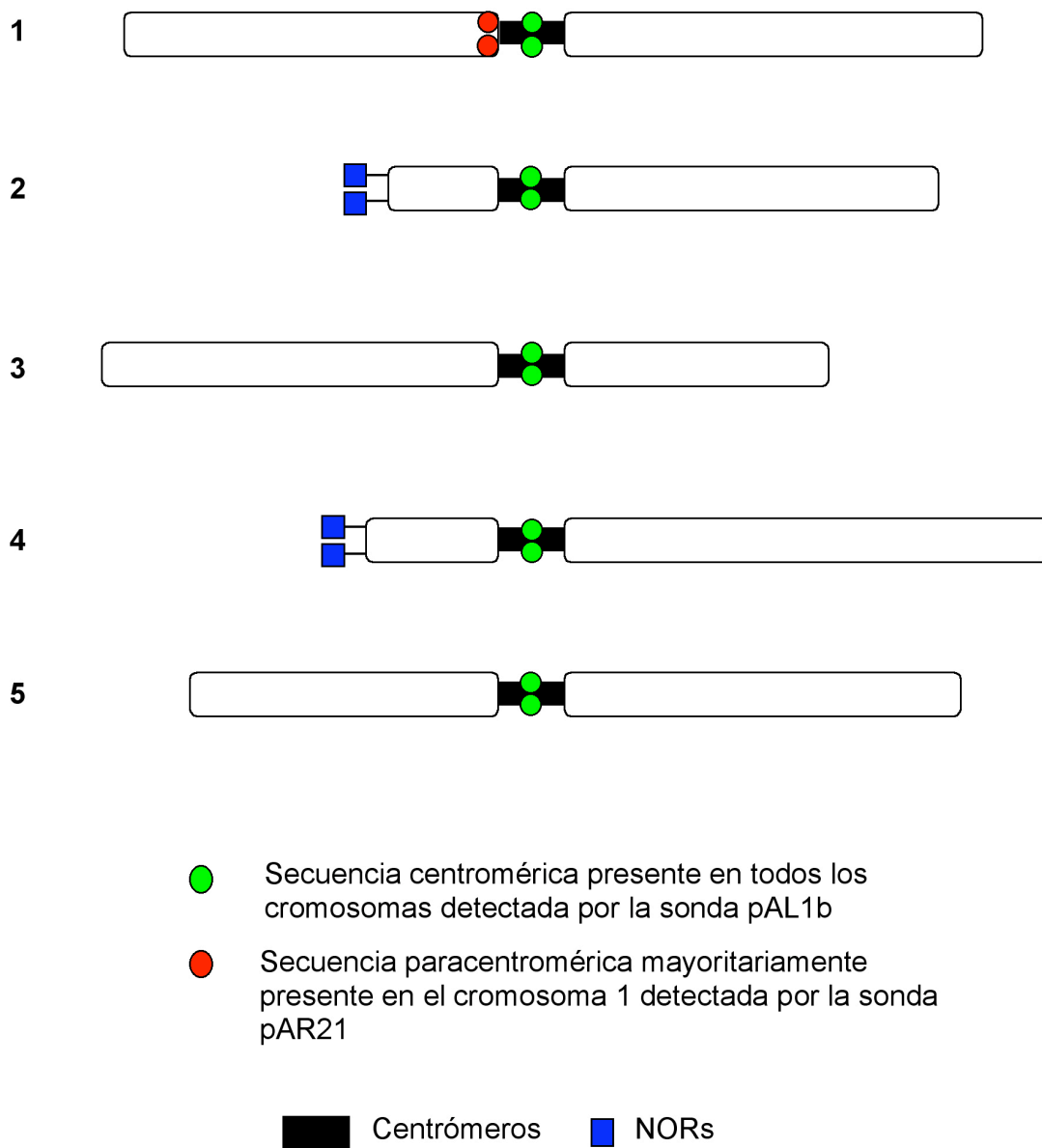


Figura 5: Localización de las zonas de hibridación de las sondas pAL1b y pAR21 utilizadas en FISH sobre el idiograma de los cromosomas del complemento haploide de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia.

8.4. Captura y tratamiento de imágenes

Las preparaciones se montaron en una solución del medio de montaje Vectashield *Mounting Medium* (H-1100, Vector) 1/10 (v/v), DAPI 2,5 ng/μL y se observaron finalmente al microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot o en un microscopio Confocal Ultra espectral LEICA TCS-SP2-AOBS-UV. Las células seleccionadas fueron fotografiadas con una cámara CCD Cool Snap. Se utilizó el programa Adobe Photoshop 7,0 para la edición de las imágenes.

9. Análisis molecular de plantas

9.1. Extracción de RNA y RT-PCR semi-cuantitativa

Se extrajo RNA de plantas de 30 días de desarrollo, que crecieron en condiciones de esterilidad, usando el kit “*RNAeasy plant RNA extraction*” (Qiagen, Germany). Se sintetizó cDNA a partir de 1 μg de RNA, siguiendo el protocolo del fabricante (Promega, USA). Las reacciones de PCR se realizaron calculando el número de ciclos necesarios en base a la curva de saturación para la *Actina2* (Thorlby *et al.*, 2004) (25 ciclos), *S6K1* y *S6K2* (At3g08720) (40 ciclos). Las RT-PCR semi-cuantitativas se realizaron en 35 ciclos, usando los partidores descritos en la Tabla 3.

Tabla 3: Lista de los oligonucleótidos utilizados.

Clon S6K1	S6K1-TOPO-F 5'-CACCATGGTTTCCTCTCAGCGTCCGTC-3' S6K1-TOPO-R 5'-CTAGCGGCCGCCCCAAAGTAGTTGTGGA-3'
Búsqueda de mutantes ++/ <i>s6k1s6k2</i>	T-DNA LB11 5'-CAGACCAATCTGAAGATGAAATGGGTATCTGGG-3'
	S6K1-Fw 5'-ATGGTTTCCTCTCAGCGTCCTGTC-3' S6K1-Rev 5'-CAAAGTAGTTGTGGACTGGTGA-3' S6K2-Fw 5'-ATGGTTTCTTCTCAGTGTTCTGTT-3' S6K2-Rev 5'-CAAGTTGGATGTGGTCCGATGAA-3'
RT-PCR semi-cuantitativa	S6K1/At3g08730 FW 5'-ATGGTTTCCTCTCAGCGTCCT-3' Rev 5'-CAAAGTAGTTGTGGACTGGTGA-3'
	S6K2/At3g087320 FW 5'-ATGGTTTCTTCTCAGTGTTCTGTT-3' Rev 5'-CAAGTTGGATGTGGTCCGATGAA-3'
	Act2/At1g49240 (Thorlby <i>et al.</i> , 2004) FW 5'-CTTCCCTCAGCACATTTCCAGG-3' Rev 5'-CCCAGCTTTTTAAGCCTTG-3'

9.2. Análisis molecular de protoplastos

9.2.1. Cultivos de protoplastos

Se realizaron cultivos en suspensión de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) según Magyar (2005). Los protoplastos se cultivaron en medio MS (*Murashige and Skoog medium* de Sigma Aldrich), con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1 mM, en oscuridad, con agitación continua a 27°C. El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es una auxina sintética que se usa para provocar la inducción del callo en cultivos celulares de plantas, y para mantener células en un estado no diferenciado. La sincronización de los cultivos se llevó a cabo cuatro días después de realizar el sub-cultivo. Se tomó una alícuota del cultivo de 20 mL en fase logarítmica de crecimiento que se diluyó en 100 mL de medio de cultivo fresco MS que contenía 5 mg/mL de afidicolina (Sigma Aldrich) y se incubó durante 24 horas. Para liberar las células del bloqueo producido por la afidicolina, las células en cultivo se centrifugaron suavemente para eliminar el medio de cultivo y se lavaron en 1 L de medio de cultivo MS y luego se resuspendieron en 100 mL de medio MS. Se tomaron muestras de estos cultivos cada dos horas. Las transformaciones se realizaron con polietilenglicol según Anthony *et al.* (2004). En cada ensayo, se transfectaron 5 µg de plásmido de DNA en 5×10^5 células. Las células se cultivaron durante 24 horas, en presencia o en ausencia de 2,4-D, después de su cosecha.

La sincronización de cultivos celulares se puede llevar a cabo ya sea eliminando toda fuente de sacarosa y luego reponiéndola en el medio de cultivo o por bloqueo y liberación de las células con afidicolina. En este trabajo, la sincronización de las células en cultivo se realizó usando afidicolina, que inhibe las DNA polimerasas α y ϵ (Sala *et al.*, 1980), deteniendo el desarrollo de la interfase celular, recién comenzada la fase S. Sorrell *et al.* (2001) obtuvieron 90% de células en fase S al final del periodo de incubación y se alcanzaba un índice mitótico entre 45 y 50%. Por su parte, Menges y Murray (2002) en cultivos de protoplastos de las líneas MM1 y MM2d lograron obtener un 80% de células en fase S y más de un 90% de células en fase G2, con una clara separación de las fases del ciclo celular.

9.2.2. Co-inmunoprecipitación de S6K1, E2FB y RBR1

Se congelaron alícuotas de cultivos en suspensión de células de *Arabidopsis thaliana* control (Columbia) y transformadas (*XVE-S6K1-HA*) inducidas con b-estradiol, a los tres días de comenzar el sub-cultivo, cuando la expresión del complejo proteico S6K1-HA alcanzó su máximo nivel. La co-inmunoprecipitación (Co-IP) se realizó como lo describen Magyar *et al.* (2005) con algunas modificaciones: se usaron 400 µg de las proteínas totales extraídas que se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo anti-E2FB (Magyar *et al.*, 2005). Se agregó a estas muestras 50 µl de una mezcla 1:1 de esferas recubiertas con extracto de la proteína A o de la proteína G, se incubaron durante otras 2 horas a 4°C, y luego se lavaron tres veces. Las proteínas se eluyeron en tampón de carga 2x SDS y posteriormente se usaron para ensayos de *Western blot* con los anticuerpos anti-E2Fb, anti-DPa, anti-CDKB1;1, anti-PSTAIRE.

9.2.3. Transfección de protoplastos de *Arabidopsis* y análisis de proteínas del ciclo celular

Las construcciones *S6K1-HA*, *Myc-E2FB*, *E2Fb-RNAi*, *S6K1-RNAi* y *S6K2-RNAi* se transfectaron en protoplastos provenientes de cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* según Magyar *et al.* (2005). Después de 24-72h de incubación, las células se recuperaron y se extrajeron las proteínas. Para los análisis por *Western blot* se usaron entre 10 y 15 µg de cada proteína. El número de células se determinó a partir de una alícuota de células del cultivo y después de una breve centrifugación, los *pellets* fueron congelados en nitrógeno líquido (Magyar *et al.*, 2005). Las muestras se tiñeron con DAPI (kit CyStain UV Precise P) y se analizaron en un citómetro de flujo Partec PAS II.

Para determinar la actividad de *CDKB1;1* (promotor CDKB1;1::GUS) o la actividad de CDKB1;1 con los sitios E2F mutados en el promotor (Boudolf *et al.*, 2004) combinados con las construcciones RNAi para los genes *E2Fb* y *S6K1* se transformaron protoplastos con 10 µg en cada caso. Los ensayos se repitieron tres veces,

y cada uno fue realizado por triplicado en presencia de 1 mg/L de 2,4-D.

En el estudio de los reguladores del ciclo celular, se usaron 15 µg de las proteínas totales extraídas desde los protoplastos transfectados con GFP (control) o con la construcción *S6K1*-RNAi (10 µg/transfección). Posteriormente, las proteínas del ciclo celular se detectaron con los siguientes anticuerpos: anti-E2Fb, anti-CDKB1;1, anti-DPa (Magyar *et al.*, 2005) y anti-PSTAIRE (Sigma-Aldrich). Cada experimento se repitió tres veces. Los *Western blot* de proteínas de *Arabidopsis* de tipo silvestre (Col-0) o de mutantes *s6k1s6k2/++* se realizaron por extracción total de proteínas a partir de plantas de 2 semanas de desarrollo. Se utilizaron 35 µg de estas proteínas para los ensayos de *Western blot* y el anticuerpo anti-E2Fb. Este ensayo se repitió dos veces usando plantas cultivadas en medio de cultivo estéril, bajo condiciones de día corto en dos periodos diferentes.

9.2.4. Ensayos de proteíncinasas

Para determinar la actividad total de la cinasa CDK, los protoplastos se transformaron con 10 µg de la construcción *GFP* (control) o de la construcción *S6K1*-RNAi y se extrajeron las proteínas totales. Las proteínas totales se purificaron por afinidad con esferas de Sefarosa recubiertas de p13^{suc1}, que posteriormente se usaron en ensayos de cinasa con 1 µg de histona H1 como sustrato (Magyar *et al.*, 2005). La actividad de S6K1 en la región activa (*pocket region*) de RBR1 (RBR1-PR) se midió en protoplastos transfectados con las construcciones S6K1-HA, S6K1-HA+E2Fb-RNAi, S6K1-cinasa inactiva (KD)-HA y S6K1-KD-HA+E2Fb-RNAi. Se utilizó el anticuerpo anti-HA para inmunoprecipitar S6K1 y los ensayos de actividad de la cinasa se realizaron también siguiendo a Anthony (2004). Las reacciones se realizaron en un gel SDS-PAGE al 10%. La señal de fosforilación se detectó en un *Phospho imager Typhoon 9410* y se cuantificó con el programa ImageQuant (GE Healthcare, Sweden).

RESULTADOS

1. Niveles de expresión de las cinasas S6K1 y S6K2 en plantas *++/s6k1s6k2* y *S6K1(XVE-RNAi)*

1.1. Plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2*

Realizamos ensayos de RT-PCR cuantitativa en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* para comprobar la eficacia de la mutación de los genes *S6K1* y *S6K2*. Para ello, determinamos los niveles de RNA mensajero (mRNA) transcrito de ambos genes. No fue posible obtener líneas viables en las que se diera una completa pérdida de la expresión de los genes *S6K*. Esto está de acuerdo con la inviabilidad de las plantas homocigotas, como se ha comentado arriba.

En las plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* tanto la expresión de los genes *S6K1* como la de *S6K2* fueron menores en relación a su expresión en plantas WT (Figura 6A). Como se puede observar, los niveles de transcrito para el gen *S6K1* se reducen a la mitad (un 52% con respecto a los encontrados en plantas de tipo silvestre). A su vez, el nivel para el gen *S6K2* fue de un 57% con respecto al nivel detectado en el WT (Figura 6A).

1.2. Plantas *S6K1*(XVE-RNAi)

Para estudiar si pudiera haber un papel diferencial de ambos genes en el crecimiento total de las partes aéreas de la planta preparamos varias líneas *S6K1*(XVE-RNAi), entre las cuales la línea 3 y 6 fueron las que dieron mejores resultados. Al estudiar el comportamiento de estas líneas *S6K1*(XVE-RNAi) comprobamos que la interferencia por RNAi para el producto del gen *S6K1* también afecta a la expresión del gen *S6K2* (Figura 6B), lo que no es de sorprender dada la homología que existe entre ambos genes. El RNAi inducido por β -estradiol bloquea, pues, si bien de forma parcial, la expresión de ambos genes *S6K1* y *S6K2*. El trabajo se hizo en condiciones de disminución de las cinasas *S6K1* y *S6K2*, ya que no se bloqueó totalmente la expresión, dado que no se puede forzar el bloqueo total de ambos genes porque es letal para la planta, como vimos en las plantas heterocigotas $+/s6k1s6k2$.

La presencia de la secuencia RNAi insertada, fue confirmada mediante PCR en las plantas de las líneas 3 y 6 de *S6K1*(XVE-RNAi). En estas líneas, los niveles de transcrito en ausencia de β -estradiol fueron menores a los niveles presentes en plantas de tipo silvestre (WT), como vemos en el panel izquierdo de la figura 6B. Esto se podría deber a una expresión basal de la construcción RNAi, debido a que ésta se encuentra en un promotor que se expresa de manera constitutiva. Como era de esperar, en plantas de la línea 3 tratadas de forma que dicha expresión era inducida con β -estradiol, los niveles de transcrito de los genes *S6K1* y *S6K2* se redujeron, hasta llegar a ser de un mínimo del 25% para el gen *S6K1* y de un 37,5% para el gen *S6K2* del nivel medio presente en plantas WT (Figura 6B). La variabilidad de las respuestas en niveles de transcrito obtenida en las diversas líneas era notable. Así, por ejemplo, las plantas de la línea 6 presentaron una reducción del 50% en el transcrito del gen *S6K1* y ligeramente superior (del 55%) en el transcrito correspondiente al gen *S6K2*, en relación al nivel de mRNA presente en plantas de tipo silvestre (datos no mostrados). La presencia de la construcción RNAi está, pues, afectando de forma semejante a la expresión de los genes *S6K1* y *S6K2* en plantas inducidas (Figura 6B). Elegimos usar para este estudio la línea 3 *S6K1*(XVE-RNAi) debido a que la expresión del gen *S6K1* disminuyó en mayor grado en las plantas de esta línea que en las plantas de la línea 6.

Las condiciones marcadas con un asterisco (*) en la parte inferior de la figura 7 son las que se van a comparar a lo largo de esta tesis: plantas de tipo silvestre (WT), plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y plantas de la línea 3 *S6K1*(XVE-RNAi), éstas últimas cultivadas en presencia de β -estradiol, es decir, en las que la construcción RNAi ha sido inducida.

2. Crecimiento de plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y de plantas *S6K1*(XVE-RNAi)

El estudio del genotipo llevado a cabo con cebadores específicos para el T-DNA y para los genes *S6K*, en plantas de la tercera generación (M3) después de producir la mutagénesis de la línea mutante $++/s6k1s6k2$, reveló la ausencia de homocigotos. Este resultado sugiere que el mutante homocigoto no es viable y, que la ausencia total de ambas cinasas S6 (*S6K1* y *S6K2*) es letal para la planta.

Las plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$, crecidas en condiciones idénticas a las plantas WT, siempre presentan un tamaño menor que las plantas silvestres (WT), como se puede apreciar en relación a su parte aérea a los 50 días de plantadas las semillas (Figura 7). En estas plantas se observa que a estos días ya ha tenido lugar el desarrollo floral, no sólo en el WT sino también en las plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y en las plantas *S6K1*(XVE-RNAi).



Figura 7: Desarrollo de plantas de tipo silvestre (WT), de plantas heterocigotas $+/s6k1s6k2$ y de plantas $S6K1(XVE-RNAi)$ en las que el gen $S6K1$ ha sido silenciado por RNAi, a los 50 días de haber sido sembradas las semillas. Las barras representan 1,5 cm y son comunes para todas las imágenes.

3. Papel de las cinasas S6K en células somáticas en proliferación

3.1. Tamaño de la hoja y de sus células epidérmicas en relación a la presencia de las proteínas S6K

Las plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$, que presentan un crecimiento menor que las plantas WT cultivadas bajo las mismas condiciones, tienen hojas de menor tamaño que las plantas WT, como se ve en la figura 7. Este hecho se puede deber bien al menor tamaño de sus células o a que el número de células presentes en sus hojas sea menor en el heterocigoto $+/+s6k1s6k2$ que en plantas de tipo silvestre. Para discernir entre ambas posibilidades, se observaron las células de la epidermis superior de hojas, mediante microscopía electrónica de barrido, comparando las células de la epidermis superior (cara adaxial) de la tercera hoja (a los 30 días de desarrollo) de plantas de tipo silvestre (WT) con las de plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$, bajo condiciones semejantes de cultivo. Ese momento de desarrollo corresponde a una etapa intermedia del crecimiento de la hoja, en el que se ha alcanzado aproximadamente un 70% de su tamaño final, por lo que aún sigue creciendo (Donnelly *et al.*, 1999).

Este análisis señala que en plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$, las células de la epidermis superior de la hoja son de menor tamaño que las de plantas de tipo silvestre (WT) (Figura 8A). Así, el tamaño medio de las células de hojas de plantas WT es de $1049 \pm 47 \mu\text{m}^2$, mientras que el de las células de plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$ es de $526 \pm 37 \mu\text{m}^2$.

Se cuantificó también la frecuencia de células con distintos tamaños en las mismas hojas y calculamos su distribución tanto en el heterocigoto $+/+s6k1s6k2$ como en el WT (Figura 8B). En plantas de la línea $+/+s6k1s6k2$, los tamaños de las células epidérmicas eran menores que los de las plantas silvestres (WT). Por ejemplo, un 32,6% de las células epidérmicas de la hoja de las plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$ mostraban una superficie menor de $250 \mu\text{m}^2$, mientras que sólo el 5,3% de las células de plantas WT presentaban este tamaño. Por otra parte, existía en el WT una frecuencia del 43,4% de células mayores a $1.001 \mu\text{m}^2$, mientras que en el heterocigotos $+/+s6k1s6k2$

esta frecuencia era muy inferior (12,8%). Ambos tipos de plantas presentaron porcentajes similares (alrededor del 50%) de células de tamaño mediano, entre 251 y 1.000 μm^2 (Figura 8B).

Los resultados obtenidos sugieren, pues, que la reducción en los niveles de las cinasas S6 (S6Ks) hace disminuir el tamaño medio de las células de la epidermis superior de la hoja y, como consecuencia, el tamaño de las hojas.

Para corroborar los resultados anteriores, se determinó el número total de células epidérmicas presentes en la cara adaxial de la tercera hoja de plantas WT y de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* (plantas de 30 días de desarrollo), basándonos en medidas del área total de las hojas y en el tamaño celular medio. No encontramos diferencias significativas entre el número de células epidérmicas presentes en hojas de plantas silvestres (WT) y en hojas de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2*. Estas observaciones confirman que la reducción en el tamaño de las hojas en plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* se debe principalmente a una disminución de la expansión o alargamiento celular que tiene lugar cada vez que cada una de las células en proliferación ha abandonado su mitosis o endomitosis. Como aparentemente no existe reducción en el número de células presentes en las hojas de estas plantas, se puede concluir que el número de ciclos que ha recorrido la célula inicial de la hoja hasta alcanzar el tamaño foliar final no está afectado al día 30 de desarrollo de la planta.

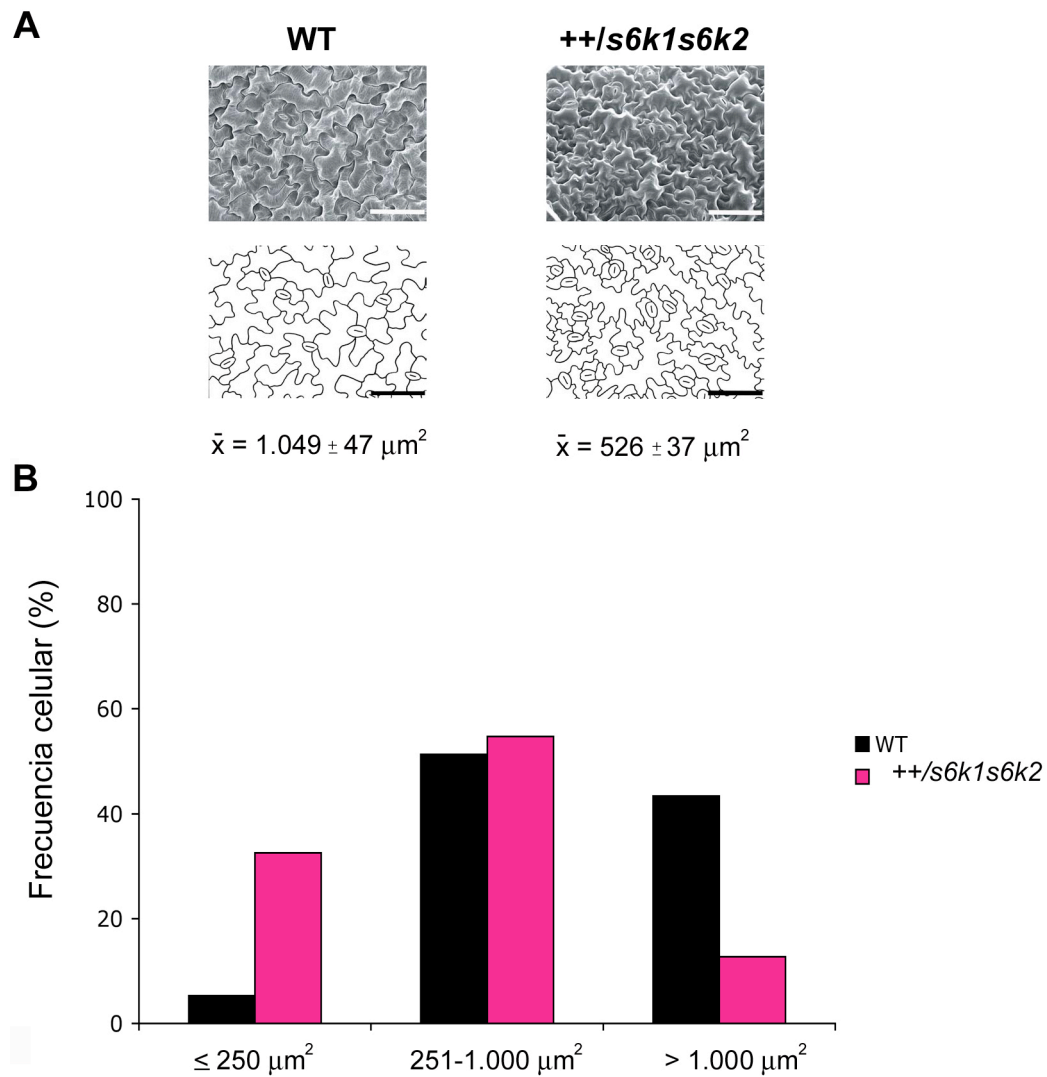


Figura 8: (A) Micrografías electrónicas de barrido de superficie de la epidermis foliar (terceras hojas a 30 días de desarrollo) de plantas de tipo silvestre (WT) y de plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y tamaño medio de las células. Las dos imágenes inferiores corresponden a interpretaciones de las imágenes mostradas arriba. Las barras corresponden a 50 μm . (B) Histograma de la distribución de células de la epidermis de hojas de las plantas correspondientes según el tamaño.

3.2. Contenido de DNA en células epidérmicas de la hoja

Para determinar la ploidía de los núcleos de plantas de tipo silvestre (WT), de plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y de las plantas $S6K1(XVE-RNAi)$ se realizaron mediciones del contenido en DNA por citometría de flujo, en hojas de dos semanas de desarrollo. Observamos que en plantas WT, las células de la epidermis superior de la hoja presentan mayoritariamente núcleos con contenido diploide, es decir con 10 cromosomas, tanto en etapa G1 (2C) como en G2 (4C) además de presentar una población tetraploide, tanto en G1 (4n, 4C) como en G2 (4n, 8C) (Figura 9A).

En plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$, además de las poblaciones diploides y tetraploides observadas en las hojas de plantas WT, se observaron también células octoploides con un contenido de DNA compatible con su presencia en G1 (8n, 8C) y en G2 (8n, 16C) (Figura 9B). En plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ hay, pues, células diploides, tetraploides y octoploides, de forma que la disminución de los niveles de las cinasas S6Ks induce, o al menos anticipa la poliploidización nuclear en este tejido (como demuestran los incrementos en el contenido en DNA). Este hecho viene también apoyado por la disminución del número de células con núcleos cuyo contenido nuclear es 2C y el aumento en el número de células con núcleos 8C.

Incrementos similares en el contenido de DNA se observan en las células de plantas $S6K1(XVE-RNAi)$, en relación a los que se observan en las células de plantas de tipo silvestre (Figura 9C). En las células de plantas $S6K1(XVE-RNAi)$ también se observa una disminución de las células 2C en relación a las células de plantas WT y un aumento del número de células 16C con respecto a las células del heterocigoto $++/s6k1s6k2$. Éstos corresponden a células octoploides en la etapa G2 de su ciclo celular.

Ahora bien, estos datos no nos permiten discriminar cuál es la frecuencia de células con contenido 4C pertenecientes al G2 del ciclo de las células diploides (2n, 4C) y cuál es la frecuencia que corresponde a células que se encuentran en G1 del ciclo ya tetraploide (4n, 4C) (Figuras 9A, B y C). De forma análoga sería posible que el pico 8C no estuviera sólo formado por células G2 de la población

tetraploide ($4n$, $8C$), sino que algunas de sus células pudieran estar en el G1 de un hipotético ciclo de células octoploides ($8n$, $8C$) (Figuras 9B y C). Por ello, decidimos utilizar técnicas que permiten estudiar directamente la ploidía (o número de cromosomas presentes en los núcleos de células en interfase, como se muestra en la tabla 2. Sólo este doble estudio de contenido de DNA y de número cromosómico permite definir las etapas del ciclo celular en células en proliferación en tejidos en células con grados distintos de ploidía.

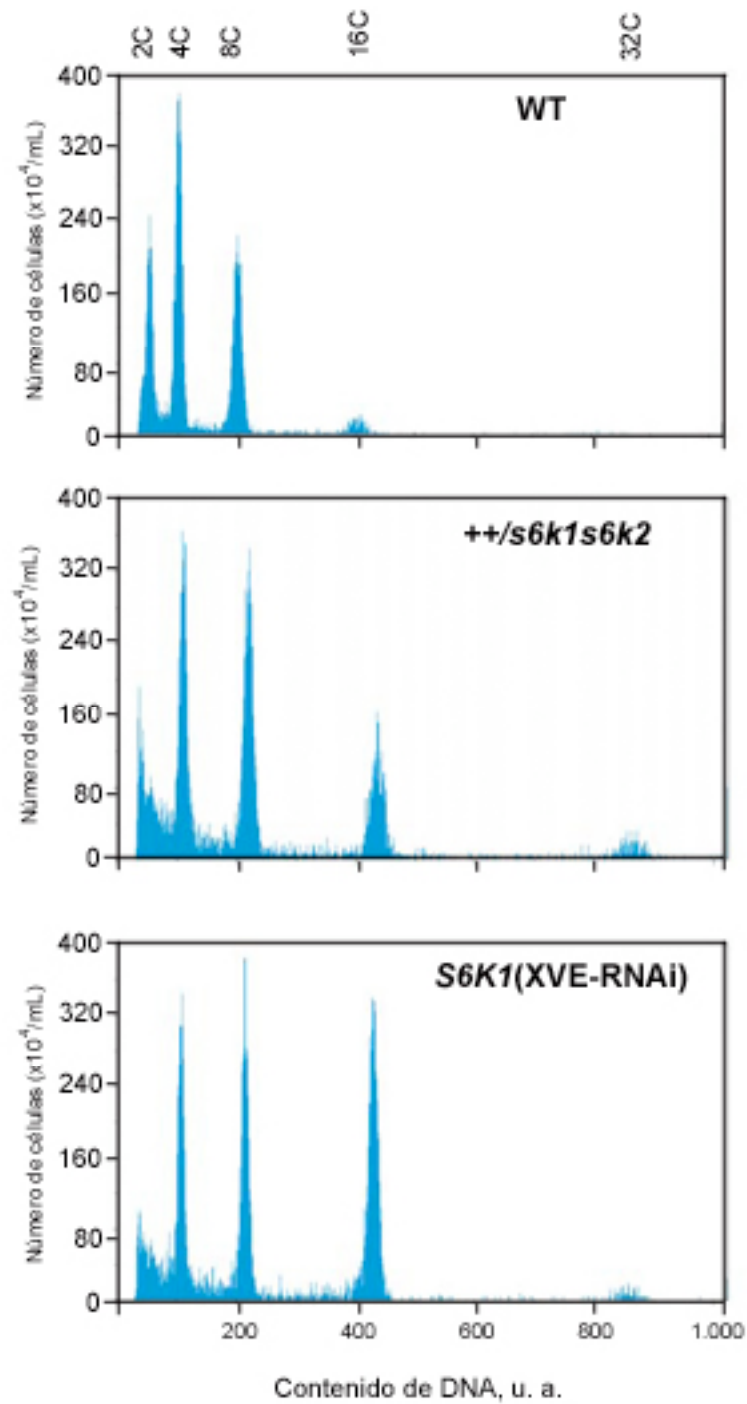


Figura 9: Cuantificación por citometría de flujo del número de células foliares con distintos contenidos de DNA, en núcleos teñidos con DAPI, a las dos semanas de desarrollo. Estudio en plantas WT, en heterocigotas *++/s6k1s6k2* y en plantas *S6K1(XVE-RNAi)*. u. a., unidades arbitrarias.

3.3. Valoración de ploidía de las células de plantas WT, *+/+s6k1s6k2* y *S6K1*(XVE-RNAi)

3.3.1. Tinción de cromocentros con DAPI

El bajo índice mitótico observado en las células proliferantes de *Arabidopsis thaliana*, así como el pequeño tamaño de sus cromosomas hace difícil realizar el cariotipo convencional en la mitosis de sus células somáticas. Para superar esta seria limitación, y con el fin de determinar cuál es la causa del incremento del contenido de DNA observado por citometría de flujo en las células de las plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2* y de las plantas *S6K1*(XVE-RNAi), se hizo uso de métodos citogenéticos aplicables a células interfásicas. La tinción con DAPI permite estimar el número de cromocentros presentes en los núcleos interfásicos. Precisamente, en *Arabidopsis thaliana*, los cromocentros están formados por secuencias de heterocromatina presentes en los núcleos en interfase, que incluyen a los centrómeros de los cromosomas mitóticos (Fransz *et al.*, 2002).

Para determinar la ploidía teñimos, en primer lugar, los núcleos interfásicos de hojas y de yemas florales de *Arabidopsis thaliana* con DAPI, colorante fluorescente de ácidos nucleicos, que marca de azul brillante el DNA bicatenario (Figuras 10a y 11a, b, c y d). La fluorescencia emitida por el DAPI es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente en la célula, es decir, es un colorante estequiométrico. Sin embargo, existe una notable excepción: la tinción con DAPI se incrementa en las regiones del DNA ricas en A-T (Adenina-Timina), donde se forma un complejo estable formado por una molécula de DAPI por cada tres pares de bases.

Célula diploide de la epidermis foliar

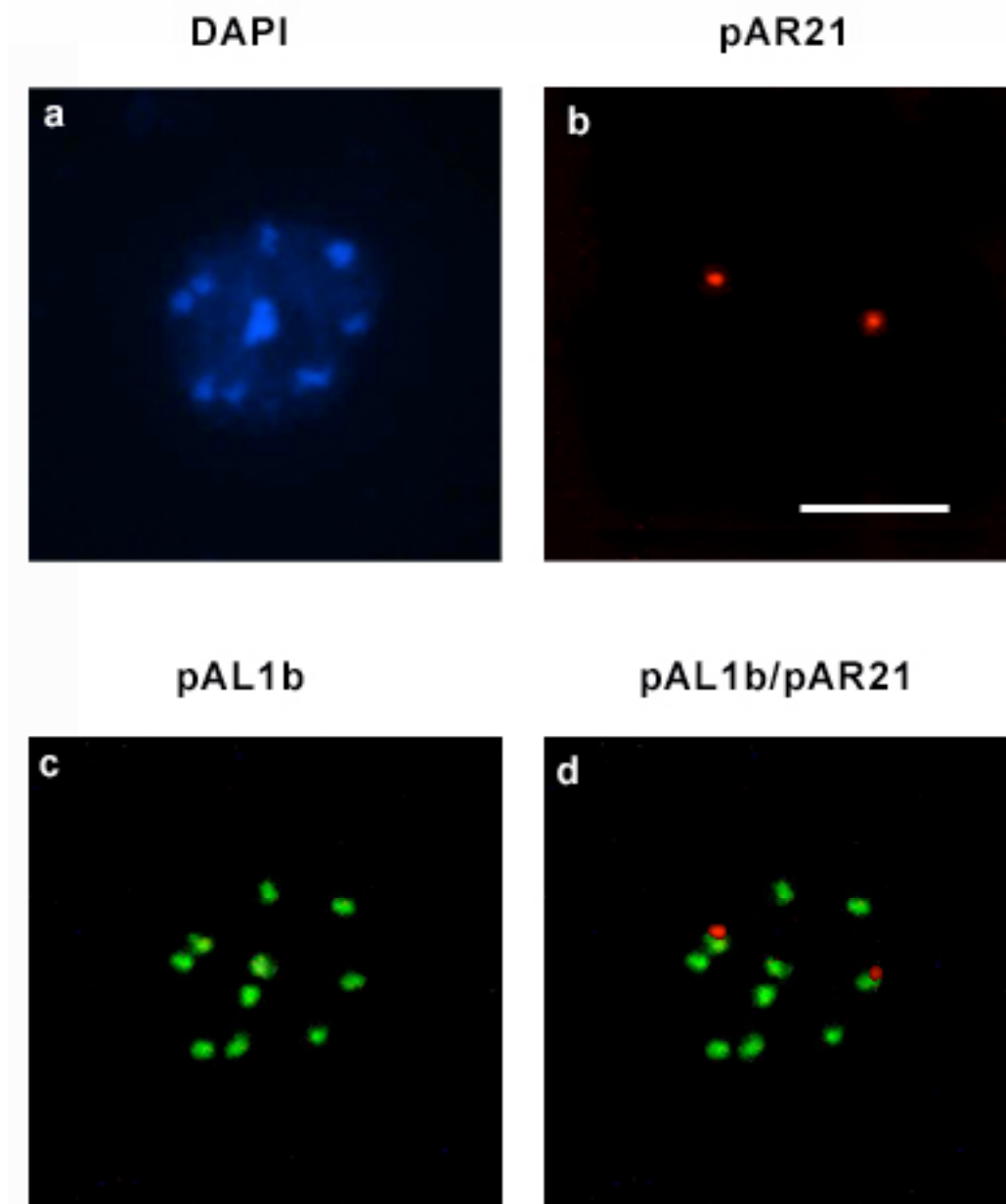


Figura 10: Determinación de ploidía nuclear en las células de la epidermis foliar, **a)** mediante localización de cromocentros por DAPI, **b)** mediante la localización por FISH de zonas paracentroméricas de los cromosomas 1 (sonda pAR21), **c)** de zonas centroméricas de todos los cromosomas del complemento (sonda pAL1b), y **d)** de zonas paracentroméricas y centroméricas con ambas sondas, en plantas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (WT). La barra en **b** representa 30 μm y aplica a todas las imágenes.

3.3.2. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para precisar más el número de cromosomas presentes en cada núcleo, se valoró el número total de centrómeros por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de secuencias centroméricas y paracentroméricas (ver idiograma en Figura 5). El estudio se realizó tanto en células de hojas como en células de yemas florales. Para ello, las células en interfase de la epidermis foliar se hibridaron *in situ* con las sondas fluorescentes pAL1b y pAR21, como vemos en las figuras 10 y 11.

En la figura 10 observamos una célula diploide de la epidermis foliar que ha sido hibridada con las sondas pAL1b y pAR21. Se observan 10 señales al hibridar usando la sonda pAL1b (Figura 10b) que pone en evidencia que la resolución de esta técnica es mayor que la que se logra al teñir los núcleos en interfase con DAPI (Figura 10a). El mismo núcleo hibridado con la sonda pAR21 (Figura 10c) presenta dos señales, lo cual confirma que se trata de una célula diploide. La figura 10d muestra una mezcla de ambas sondas en el mismo núcleo, mostrando que las zonas hibridadas con las sondas pAL1b y pAR21 son adyacentes y no se superponen. Además esto confirma que la sonda pAR21 es paracentromérica pues hibrida a un lado del centrómero de los cromosomas 1.

En la figura 11a se observa un núcleo diploide cuyos cromocentros se han teñido con DAPI. Esta tinción diferencial muestra 10 señales que corresponden a zonas centroméricas. Estas zonas centroméricas corresponden a las señales que marca con mayor definición la sonda pAL1b, como muestra la figura 11e donde se observan claramente 10 señales de color verde.

En la figura 11i se observan dos zonas paracentroméricas del par de cromosomas 1 marcadas por la sonda pAR21 (de color rojo) y en la figura 11m se muestra una mezcla de ambas sondas usando un filtro doble, que detecta las señales de las sondas pAL1b y pAR21.

Se realizaron también ensayos FISH en células de plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2* y en células de la línea *S6K1*(XVE-RNAi). En la segunda columna, el

núcleo tetraploide de planta heterocigota $++/s6k1s6k2$ presenta 20 señales con DAPI (Figura 11b), 20 señales al usar la sonda pAL1b (Figura 11f) y 4 señales al usar la sonda pAR21 (Figura 11j). Un resultado similar se observa en la tercera columna que corresponde a un núcleo tetraploide de planta *S6K1*(XVE-RNAi). En la cuarta columna, se observa un núcleo octoploide de planta *S6K1*(XVE-RNAi) que presenta 40 cromocentros teñidos con DAPI (Figura 11d), que corresponden a 40 centrómeros marcados con la sonda pAL1b (Figura 11h) y 8 zonas paracentroméricas de los cromosomas 1 marcadas con la sonda pAR21 (Figura 11 l).

Figura 11: Determinación de ploidía nuclear en las células de la epidermis foliar, mediante cuantificación de cromocentros (DAPI) y localización por FISH de zonas centroméricas de todos los cromosomas y paracentroméricas de los cromosomas 1 en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Primera fila (a, e, i, m): localización de cromocentros por DAPI.

Segunda fila (b, f, j, n): FISH con pAL1b, sonda que marca todos los centrómeros, en las mismas células de la primera columna.

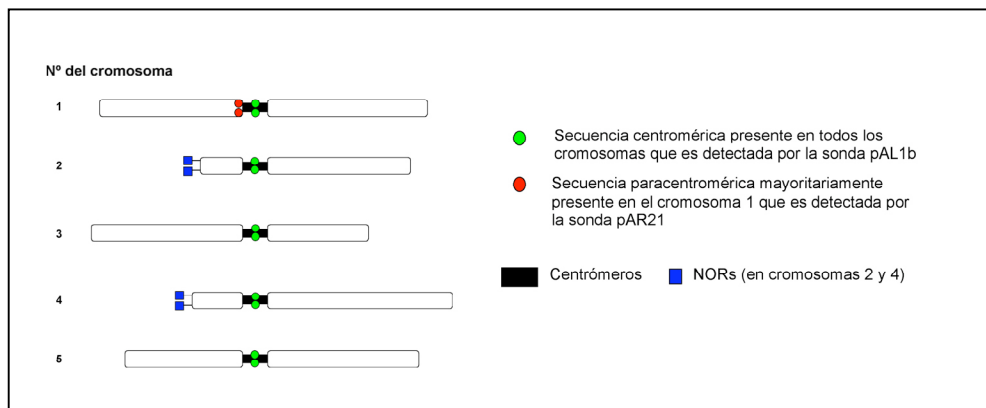
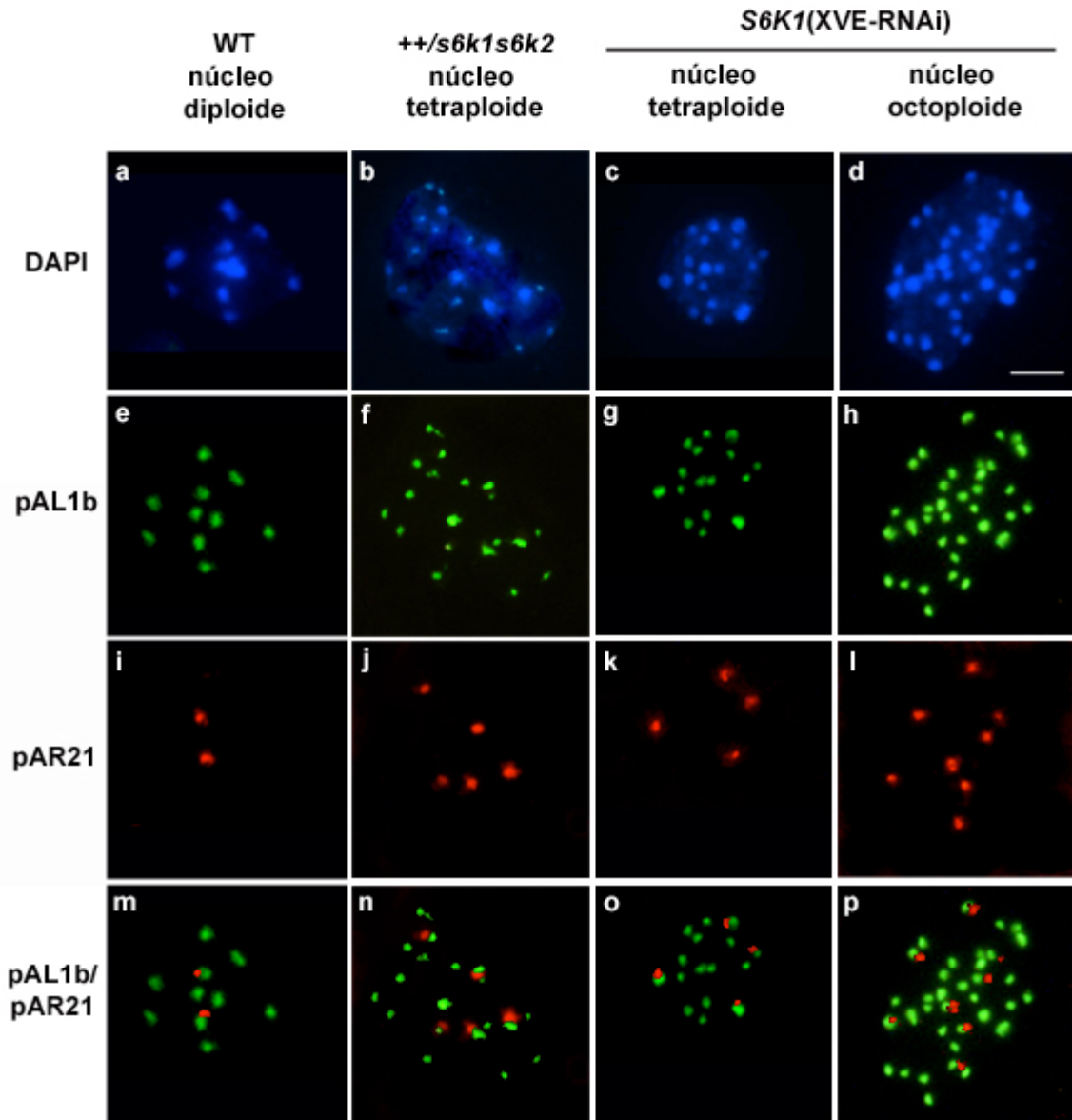
Tercera fila (c, g, k, o): FISH con sonda pAR21, sonda específica que marca la zona paracentromérica del brazo corto de los cromosomas I.

Cuarta fila (d, h, l, p): FISH con pAL1b y pAR21.

La barra de aumento en **d** corresponde a 10 μm , y es común para todas las imágenes.

Recuadro: En la parte inferior se repite la figura. 5 en la que se muestran las zonas identificadas por DAPI (heterocromatina asociada al cromocentro), así como las zonas centroméricas y paracentroméricas localizadas por las sondas pAL1b y pAR21, respectivamente.

Células de la epidermis foliar



3.3.3. Modificación en las estructuras centroméricas

En la figura 12 observamos modificaciones de las estructuras centroméricas localizadas por hibridación in situ con las sondas pAL1b y pAR21 en otras células de la epidermis foliar de plantas de tipo silvestre. En ensayos realizados con la sonda pAR21 es difícil determinar la cantidad exacta de sonda que se debe utilizar, por esta razón es fácil obtener más de dos señales en núcleos diploides o más de 4 señales en el caso de núcleos tetraploides (Figura 12 b y e). En la figura 12b vemos un núcleo de una célula en interfase que presenta tres señales para la sonda pAR21 y 8 señales al ser hibridada con la sonda pAL1b (Figura 12a), esto indicaría que se trata de una células diploide que presenta dispersión de zonas paracentroméricas de los cromosomas 1. En la figura 12e, vemos un núcleo de una célula de planta heterocigota $++/s6k1s6k2$ que presenta 6 señales con la sonda pAR21. En este caso podría tratarse bien de un núcleo tetraploide teñido con un exceso de sonda. En la figura 12d vemos en este mismo núcleo alrededor de 20 señales con la sonda pAL1b, lo cual confirma que se trata de una célula tetraploide. Esto puede deberse a que al utilizar un exceso de concentración de sonda pAR21 en los ensayos FISH la sonda pAR21 reconoce además de las zonas paracentroméricas del brazo corto del cromosoma 1, otras zonas paracentroméricas, concretamente las del cromosoma 4 y del cromosoma 5, que son las que mantienen secuencias semejantes, aunque no tan repetidas, a las que se hallan contiguas al centrómero en el brazo corto del cromosoma 1 (Zhang *et al.*, 2000).

La ventaja de utilizar la sonda pAR21 es la rapidez en contar un número reducido de señales, pero en el caso de un número intermedio de señales es mejor recurrir a la sonda pAL1b que presenta la ventaja de dar una señal por centrómero, identificando fácilmente el número de cromosomas.

Modificación de estructuras centroméricas

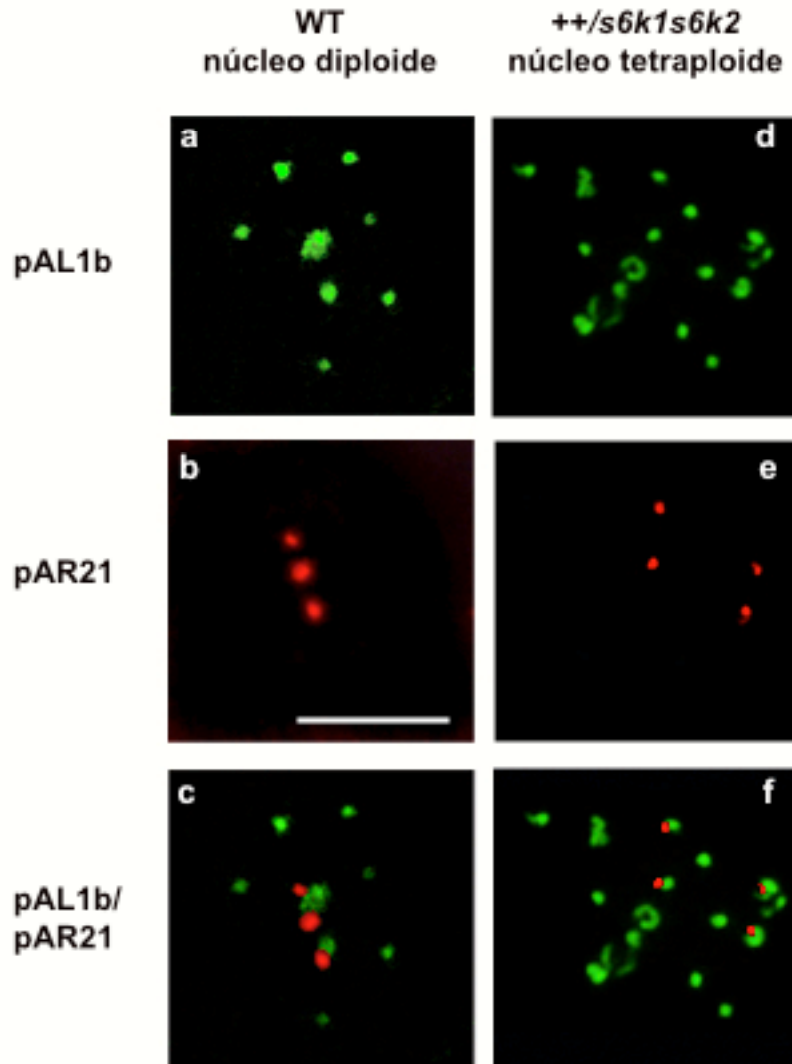


Figura 12: Cambios en la estructura de las secuencias localizadas por FISH usando las sondas pAL1b para centrómeros totales y la sonda pAR21 que hibrida con una región paracentromérica del cromosoma 1, (**a**, **b** y **c**), en un núcleo diploide de una planta silvestre (WT) y (**d**, **e** y **f**) en un núcleo tetraploide de una planta heterocigota ++/*s6k1s6k2*. La barra de aumento en **b** corresponde a 10 μm , y es común para todas las figuras.

3.4. Determinación del número de cromocentros por tinción con DAPI

El número de cromocentros en las células somáticas diploides de *Arabidopsis thaliana* debe ser 10 ($2n = 10$). Los núcleos de células de hojas de plantas de tipo silvestre muestra un valor medio menor igual a 10,1 cromocentros, mientras que en los núcleos de células de hojas de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* el valor medio de cromocentros por célula alcanza 16,6 y en las plantas *S6K1(XVE-RNAi)* llega a 18,2 (Figura 13). Al analizar la distribución de las células de la epidermis de hojas en interfase observamos que el número de cromocentros en el WT del ecotipo Columbia variaba entre 5 y 23, siendo las frecuencias más comunes las de 8 y 9 cromocentros por núcleo. Estos últimos valores modales fueron hallados en el 50,7% de las células de hojas y en el 51,9% de las células de yemas florales (Figura 13).

El que el número máximo de cromocentros observado en algunas células sea menor que el esperado (10) se explica por el fenómeno de asociación espontánea de cromocentros a nivel centromérico.

Por el contrario, en células diploides puede observarse a veces un número de regiones DAPI positivas mayor al número cromosómico correspondiente. Ello se debe a que algunas regiones no centroméricas del genoma de *Arabidopsis thaliana* fluorescen de forma similar al ser teñidas con DAPI que las zonas centroméricas. Estas zonas corresponden a los organizadores nucleolares (NORs), como se citó arriba, presentes en los pares de cromosomas 2 y 4. Así, al teñir los núcleos con DAPI, estas zonas de los NORs se pueden confundir en algunos núcleos con centrómeros, y ello puede llevar al falso incremento en el número de cromocentros cuantificados. Esto se traduce en que la valoración de ploidía por recuento de cromocentros sea sólo una valoración aproximada.

Cromocentros (DAPI) en células de la epidermis foliar

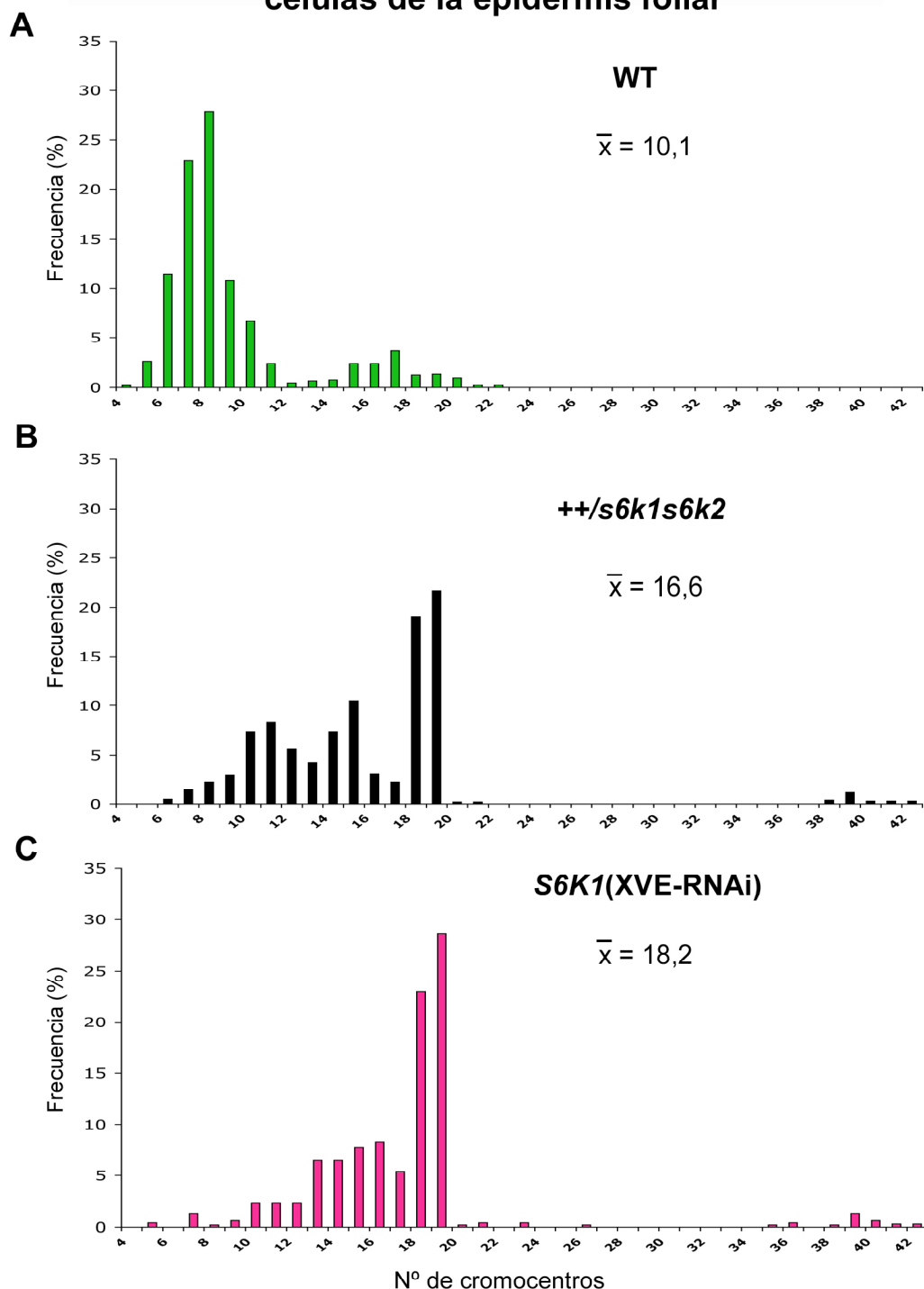


Figura 13: Frecuencia (%) de células en función del número de cromocentros (correspondientes a los centrómeros en interfase), puestos de manifiesto por tinción DAPI en células de hojas (A) de plantas de tipo silvestre (WT), (B) de plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y (C) de plantas *S6K1(XVE-RNAi)*. \bar{x} , valor medio del número de cromocentros en cada muestra.

A pesar de estas inexactitudes, el estudio de frecuencia de cromocentros por núcleo demuestra que el incremento en ploidía que se produce tanto en plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ como en las plantas $S6K1(XVE-RNAi)$ es debido a poliploidización (incremento en el número cromosómico) y no a una hipotética politenización de sus cromosomas, semejante a la que tiene lugar de forma espontánea en el tricoma en la hoja de plantas silvestres (Fransz *et al.*, 2003).

Después de obtenidos los datos correspondientes a la frecuencia de cromocentros por núcleo, podemos decir que aproximadamente 75,9% de los núcleos de células de hojas en las plantas WT son diploides, mientras que un 22,6% es tetraploide (Figura 13A). Esto confirma la existencia de dos poblaciones celulares en las hojas de plantas WT, una diploide y otra tetraploide, como sugería la citometría de flujo (Figura 9A). En las yemas florales, el 77,5% de las células es diploide, mientras que sólo el 20,4% de ellas es tetraploide (Figura 14A).

Las frecuencias de cromocentros que corresponden a células tetraploides presentes en los núcleos de células de plantas $++/s6k1s6k2$ fueron más altas que las determinadas en núcleos de células de plantas de tipo silvestre, tanto en hojas (Figura 13B) como en yemas florales (Figura 14B).

Los valores obtenidos en los experimentos anteriores para el número de cromocentros totales en células de la epidermis foliar de plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ (Figuras 13B y 14B) se compararon con los valores de contenido de DNA obtenidos por citometría de flujo (Figura 9B). Estos ensayos confirmaron el incremento en la ploidía en células de plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ frente a las plantas WT. El número de cromocentros por núcleo en células de plantas $++/s6k1s6k2$ variaba entre 7 y 22 en células de la epidermis foliar (Figura 13B) y entre 5 y 22 en células de yemas florales (Figura 14B). Los núcleos con 20 cromocentros son los que presentan una mayor frecuencia, tanto en hojas como en yemas florales. La frecuencia de núcleos tetraploides fue semejante en hojas (89,8%) y en yemas florales (90,2%). En éstas pudimos observar núcleos octoploides (8n) y núcleos con un contenido 8C. Pero este contenido en DNA podría corresponder bien a núcleos tetraploides en G2 o a núcleos octoploides en G1. La observación de núcleos 16C podría confirmar que se trata de

núcleos octoploides en G2 (8n 16C). Sin embargo es obvio que el contenido en DNA resulta ambiguo cuando se estudian poblaciones.

Al estudiar las plantas *S6K1*(XVE-RNAi), en las que se había inhibido por interferencia con un RNA la expresión génica de la cinasa S6K1, lo primero que se observó fue también un incremento general en el número de cromocentros por núcleo (Figuras 13C y 14C). El número de cromocentros por núcleo en plantas *S6K1*(XVE-RNAi) variaba entre 6 y 27 en células de hojas (Figura 13C) y entre 7 y 23 en células de yemas florales (Figura 14C), siendo las frecuencias más comunes las de 19 y 20. Cabe mencionar que la frecuencia de núcleos tetraploides es de 93% en células de hojas y de 93,1% en células de yemas florales en plantas *S6K1*(XVE-RNAi). Además observamos la presencia de células octoploides (8C, n = 40, número máximo de cromocentros) en un 3,3% de células de hojas y en un 3,2% de células de yemas florales.

Las razones entre las frecuencias obtenidas para las distintas ploidías, que en poblaciones de células ya diferenciadas permiten calcular la cantidad relativa de ambos tipos celulares, en tejidos que aún se encuentran en proliferación activa, en la que se está produciendo poliploidización, no tienen otro valor que el dar una imagen transitoria de dicho proceso.

Los datos obtenidos en la presente tesis confirman la aparición de núcleos octoploides tanto en las plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2* como en las plantas *S6K1*(XVE-RNAi).

Cromocentros (DAPI) en células de yemas florales

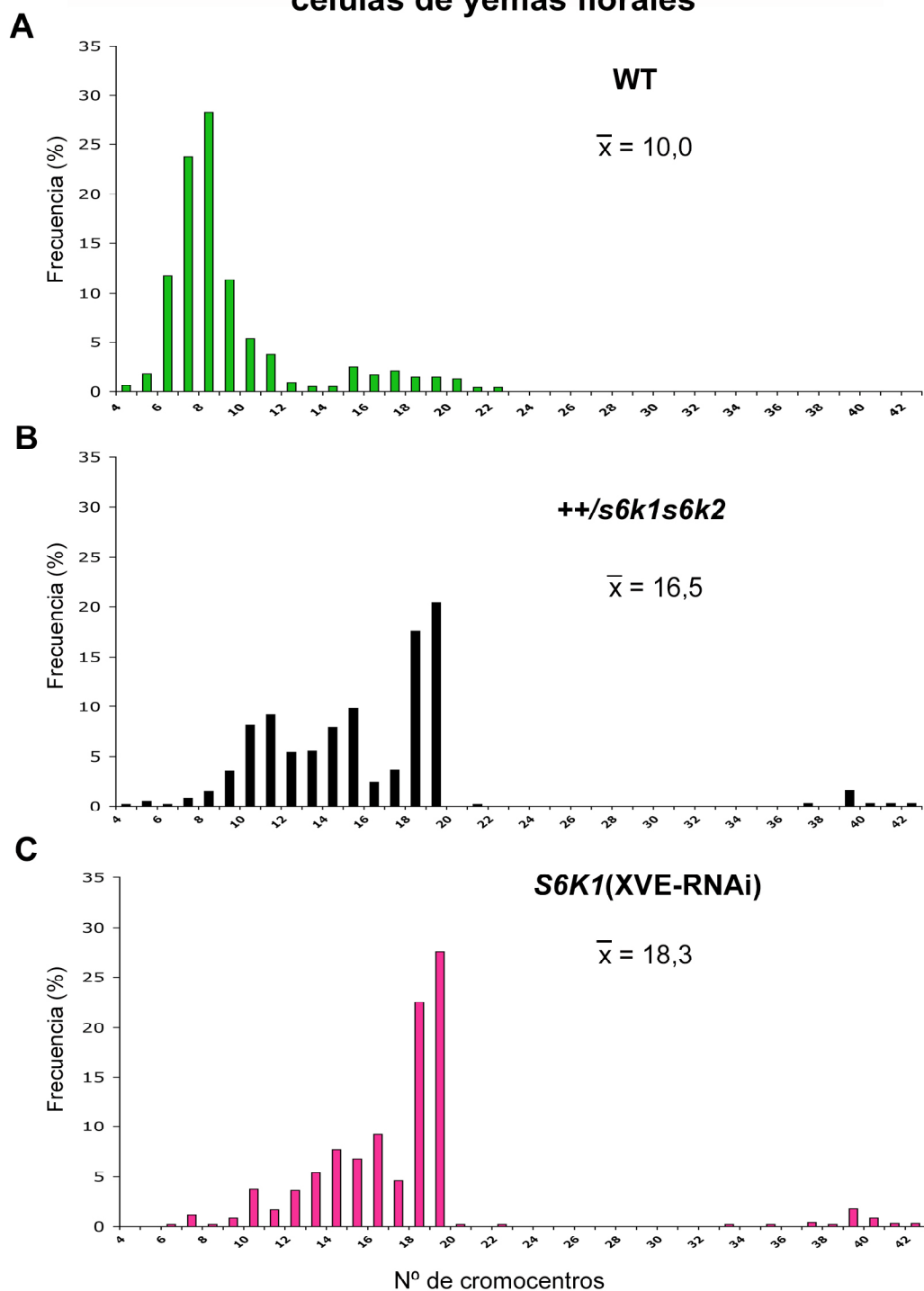


Figura 14: Frecuencia (%) de células en función del número de cromocentros (correspondientes a los centrómeros en interfase), puestos de manifiesto por tinción DAPI en células de yemas florales **(A)** de plantas de tipo silvestre (WT), **(B)** de plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2* y **(C)** de plantas *S6K1(XVE-RNAi)*. \bar{x} , valor medio del número de cromocentros en cada muestra.

3.5. Determinación del número de centrómeros por FISH

Para tratar de incrementar la precisión de los resultados obtenidos para valoración de ploidía por recuento de cromocentros después de su tinción con DAPI, se realizaron hibridaciones *in situ* con fluorescencia (FISH) para todas las regiones centroméricas (pAL1b), así como paracentroméricas (pAR21) que preferentemente se acumulan junto al centrómero en el brazo corto de los cromosomas 1 en las células en interfase.

3.5.1. Determinación del número total de centrómeros por la sonda pAL1b

Ya habíamos determinado la distribución de contenidos de DNA por núcleo y éste demostraba que la disminución en la expresión génica de las cinasas S6K1 y, en menor grado S6K2, favorece la poliploidización de los núcleos de las células de la epidermis foliar presente en plantas WT, como demostró la citometría de flujo (Figura 9A) y confirmó la valoración de cromocentros por DAPI (Figuras 13A y 14A). Al realizar FISH con la sonda centromérica pAL1b, confirmamos que esta sonda marca los centrómeros de todos los pares de cromosomas (segunda fila de la figura 11). Observamos que la frecuencia media de centrómeros por núcleo es de alrededor de 10 en el caso de los núcleos de células de hojas de plantas de tipo silvestre (WT) (Figura 11 primera columna) y alrededor de 20 en el caso de los núcleos de plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$ y de plantas *S6K1*(XVE-RNAi) (Figura 11, segunda y tercera columnas, respectivamente). Además observamos células con núcleos octoploides, como se ve para el caso de las plantas *S6K1*(XVE-RNAi) (Figura 11, cuarta columna).

Sin embargo, se presentaban variaciones alrededor de los números cromosómicos diploides y tetraploides. Se cuantificó el número de señales FISH con la sonda pAL1b en las distintas células de hojas y yemas florales (Figuras 15 y 16). En algunos núcleos, el número de señales centroméricas era inferior al número cromosómico diploide, preferentemente en células de plantas de tipo silvestre (WT). Tres condiciones pueden explicar esta aparente anomalía: a) su resolución puede estar

condicionada por la estereología de alguno de los centrómeros en relación a las masas de heterocromatina pericentromérica; b) la asociación entre centrómeros es muy íntima, de forma que algunos centrómeros dobles no pueden ser resueltos como tales o c) existen variaciones en el grado de condensación y en la estructura de las regiones contenidas en los cromocentros, y específicamente en los propios centrómeros (Figura 12). Como vemos existen importantes variaciones aunque no se ha podido seguir, por ejemplo, la correlación existente entre ellas y etapas concretas del ciclo celular. Como vemos, ésta es la explicación más plausible, los centrómeros tienen un ciclo propio que no es sincrónico para todos los centrómeros y que puede estar relacionado con patrones de expresión de las zonas que lo rodean.

En las plantas WT, la frecuencia mayor correspondía a núcleos con 7 y 8 centrómeros, con un 22,6% cada uno para núcleos de células de hoja (Figura 15A) y con 19,7% y 23,4% respectivamente para núcleos de células de yemas florales (Figura 16A). Los núcleos diploides estimados como aquellos que cuentan con 10 ó menos centrómeros, en células de plantas de tipo silvestre (WT) corresponden al 87,1% en hojas y al 88,2% en yemas florales (Figuras 15A y 16A).

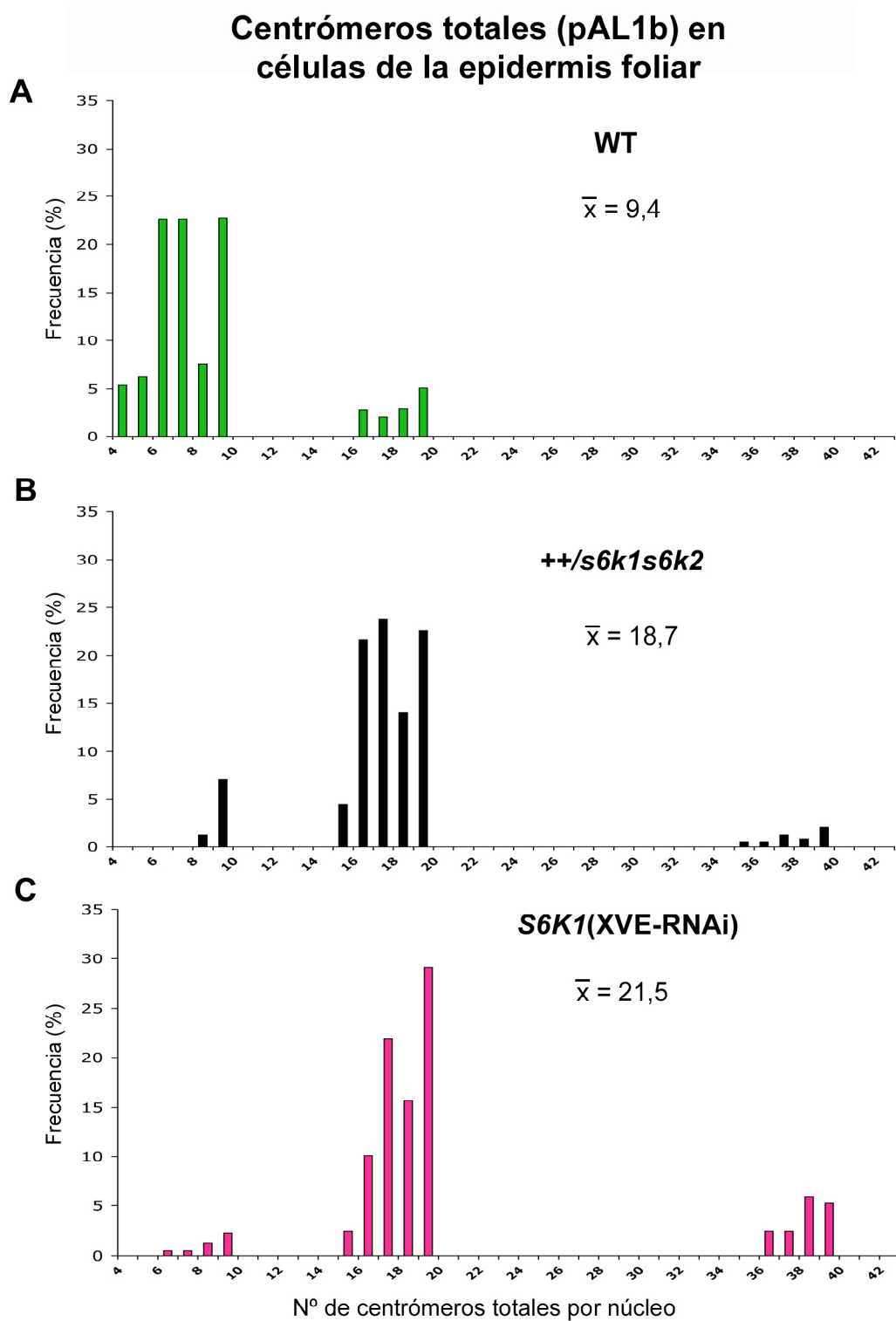


Figura 15: Frecuencia (%) de células en función del número de centrómeros totales puestos de manifiesto por FISH, usando la sonda específica pAL1b **(A)** en plantas de tipo silvestre (WT), **(B)** en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y **(C)** en plantas *S6K1(XVE-RNAi)*. \bar{x} , valor medio de la frecuencia de los centrómeros por núcleo.

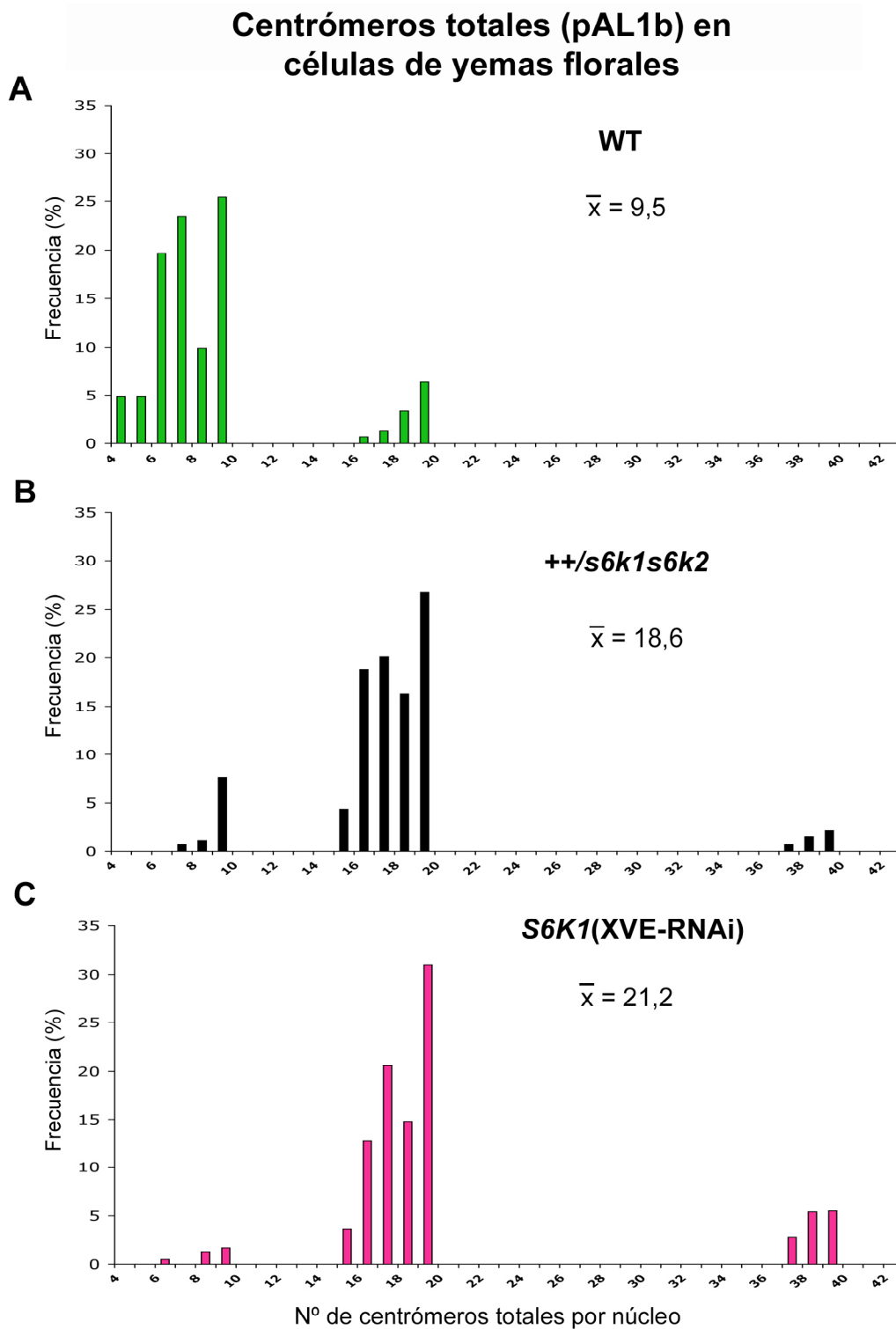


Figura 16: Frecuencia (%) de células en función del número de centrómeros totales puestos de manifiesto por FISH, usando la sonda pAL1b en núcleos de células de yemas florales **(A)** en plantas de tipo silvestre (WT), **(B)** en plantas heterocigotas ++/*s6k1s6k2* y **(C)** en plantas *S6K1*(XVE-RNAi). \bar{x} , valor medio de la frecuencia de los centrómeros por núcleo.

Como en el caso de los recuentos de cromocentros, tanto en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* (Figuras 13B y 14B), como en plantas *S6K1(XVE-RNAi)* (Figuras 13C y 14C) el número de centrómeros totales (Figura 15A y 16A) también aumentó de forma notable en relación al número de centrómeros en núcleos de plantas de tipo silvestre en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2*. Así, el número de centrómeros por núcleo variaba entre 9 y 20 (Figura 15B y 16B) y la frecuencia mayor corresponde a núcleos con 18 y 20 centrómeros (23,8% y 22,6%, respectivamente) en células de hojas y a núcleos con 20 centrómeros (26,7%) en las células de yemas florales. El 86,6% de las células de hojas y el 86,2% de las células de yemas florales son tetraploides en plantas *++/s6k1s6k2*, mientras que sólo el 5,1% de las células de hojas y el 4,4% de las células de yemas florales son perfectamente octoploides en el mismo (Figura 17).

En plantas *S6K1(XVE-RNAi)* en las que la expresión génica de la cinasa S6K1 había sido inhibida por RNAi, también se incrementó la frecuencia de señales centroméricas (Figuras 15C y 16C), variando entre 7 y 20 centrómeros en células de la epidermis foliar y de yemas florales, siendo la frecuencia media de centrómeros igual a 21,5 en células de hojas y de 21,2 en células de yemas florales. La frecuencia mayor correspondió a núcleos con 20 centrómeros en el 29,1% en núcleos de hojas y a 31% en núcleos en células de yemas florales. Las células tetraploides corresponden al 79,3% en hojas (Figura 17A) y al 82,9% en yemas florales (Figura 17B). Estos datos confirman lo anteriormente observado al teñir las células con DAPI: la carencia de las cinasas S6 favorecen la poliploidización celular como indica el incremento en el número de cromosomas de sus núcleos.

El incremento en el contenido en DNA, tanto en plantas *++/s6k1s6k2* como en las *S6K1(XVE-RNAi)*, está relacionado, pues, con un incremento en el número de los cromosomas presentes en cada una de sus células, que pasan de diploides y tetraploides en WT, hasta valores predominantemente tetraploides pero también octoploides en los heterocigotos *++/s6k1s6k2* y en plantas *S6K1(XVE-RNAi)* en las que la expresión de los genes *S6K* había sido comprometida mediante el correspondiente RNAi.

Al comparar el número de centrómeros presentes en células de hoja de plantas WT con el presente en hojas de plantas *S6K1*(XVE-RNAi) con el test estadístico χ^2 vemos que existen diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre ambos tipos celulares. También son altamente significativas las diferencias al comparar células de las yemas florales de plantas de tipo silvestre (WT) y células de plantas *S6K1*(XVE-RNAi). En cambio, no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) en el número de cromocentros en plantas *S6K1*(XVE-RNAi) cuando se comparan células de sus diferentes tejidos, tales como hojas y yemas florales.

Cuando se usa esta sonda fluorescente para todos los centrómeros, a diferencia de cuando se usa DAPI para teñir cromocentros, se producen disminuciones en la frecuencia de centrómeros por fusión, pero no existen las sobrevaloraciones en su número debidas a la intensa fluorescencia que el DAPI proporciona en zonas no centroméricas tales como las regiones de los organizadores nucleolares o NORs, entre otros (Murata *et al.*, 1990).

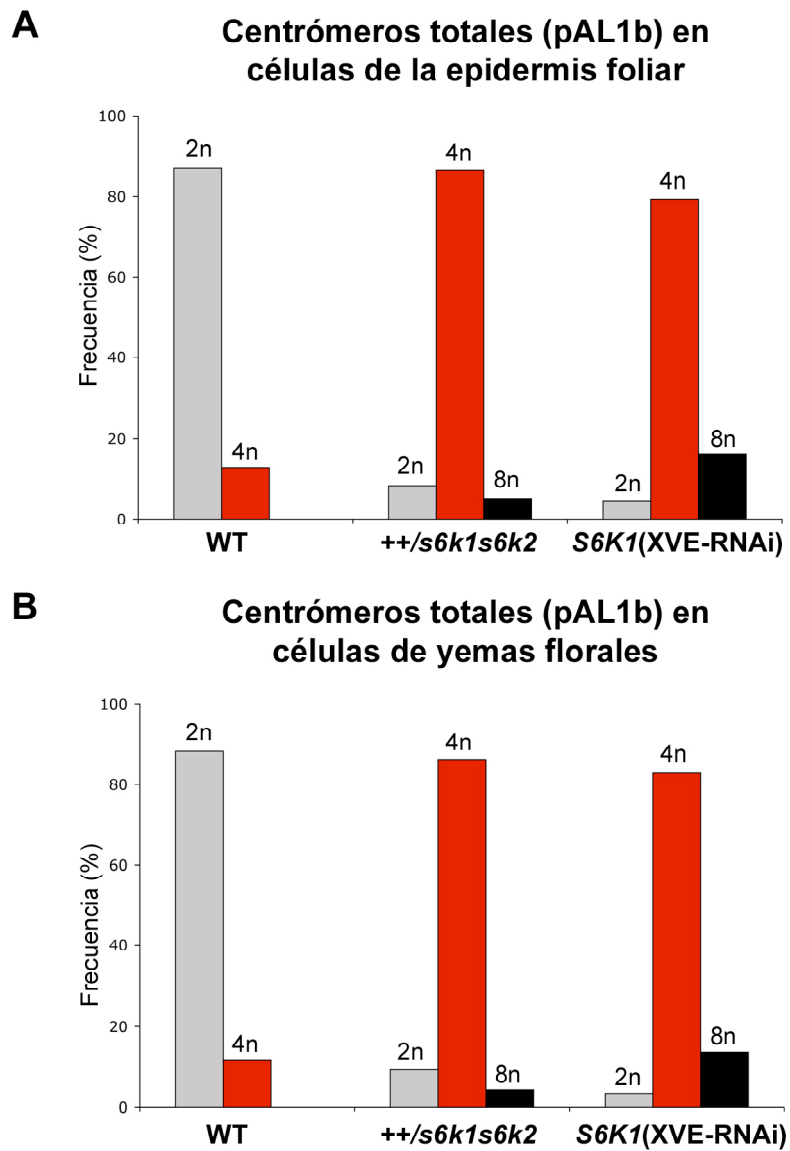


Figura 17: Incremento en ploidía puesto en evidencia por FISH al usar la sonda específica pAL1b que marca todos los centrómeros en núcleos **(A)** de células epidérmicas de hojas y **(B)** en las de yemas florales en plantas de tipo silvestre (WT), en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y en plantas *S6K1(XVE-RNAi)*. Estos datos corresponden a los valores desglosados en las figuras 15 y 16.

3.5.2. Determinación del número de cromosomas 1 mediante la sonda paracentromérica pAR21

Para confirmar los cambios de ploidía, utilizamos FISH con la sonda paracentromérica pAR21 que marca una zona del brazo corto de los cromosomas 1, que se encuentra contigua al centrómero. En la figura 11i podemos observar dos señales en el caso de una célula de hoja de planta de tipo silvestre (WT), que corresponden a la región paracentromérica de los cromosomas 1 en células diploides. Por otro lado, núcleos provenientes de hojas de plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$ y de hojas de plantas *S6K1*(XVE-RNAi) presentan cuatro señales de color rojo, con la sonda pAR21 (Figuras 11j y k, respectivamente). Esto indica que se trata, en estos casos, de células con núcleos tetraploides. Por último, tanto en plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$ como en plantas *S6K1*(XVE-RNAi), observamos la presencia de células con núcleos octoploides que presentan 8 señales al utilizar la sonda pAR21 (Figura 11 l) correspondiente a las plantas *S6K1*(XVE-RNAi).

La duplicación del número de cromosomas de $2n$ a $4n$ y de $4n$ a $8n$ sólo puede tener lugar por una modificación de la mitosis conocida como endomitosis, esbozada más arriba. Este fenómeno es el responsable de la aparición de células con núcleos tetraploides y octoploides en un tejido en proliferación inicialmente diploide, como se discutirá en el apartado correspondiente.

En plantas WT, el número de señales de las zonas paracentroméricas del cromosoma 1 (sonda pAR21) variaba entre 1 y 4 tanto en células de la epidermis foliar como en células de yemas florales. La frecuencia máxima corresponde a células con 2 señales paracentroméricas en los cromosomas 1 con 88,5% y con 89,5% en células de hojas y yemas florales respectivamente (Figuras 18A y 19A).

En plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$, el número de señales paracentroméricas variaba entre 1 y 8 en células de la epidermis foliar y de yemas florales. La frecuencia máxima corresponde a células con 4 señales en un 83,6% de células de hojas y en un 79,8% de células de yemas florales (Figuras 18B y 19B). Al

igual que en plantas heterocigotas $+/s6k1s6k2$, en plantas $S6K1(XVE-RNAi)$ el número de señales variaba entre 1 y 8. Esta mayor frecuencia también corresponde a núcleos con 4 señales paracentroméricas para el par de cromosomas 1, con 70,3% en células de hojas y 72,5% en células de yemas florales (Figuras 18C y 19C).

En la figura 20 se muestra la ploidía de las células determinada por FISH con la sonda pAR21. La sonda pAR21 que hibrida con zonas paracentroméricas de los cromosomas 1 (Figura 11 i, j, k, l) tampoco permite discriminar de forma exacta el número de cromosomas 1 presentes en un núcleo, aunque facilita de forma extraordinaria la determinación de ploidía.

Zonas paracentroméricas (pAR21) en células de la epidermis foliar

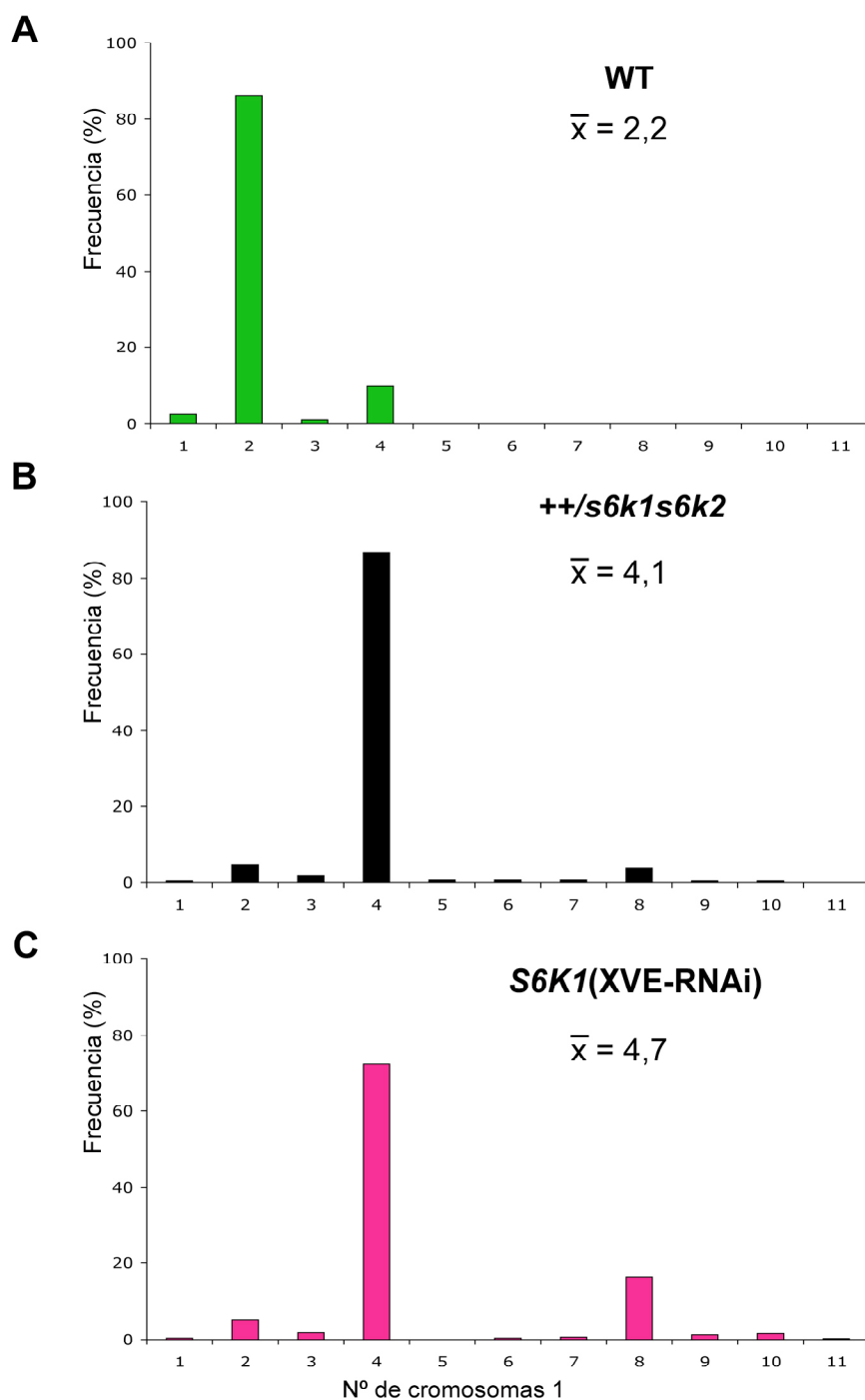


Figura 18: Niveles de zonas paracentroméricas puestas de manifiesto por FISH al emplear la sonda pAR21 que marca las zonas paracentroméricas de los cromosomas 1 en células epiteliales de hojas **(A)** en plantas de tipo silvestre (WT), **(B)** en plantas heterocigotas ++/*s6k1s6k2* y **(C)** en plantas *S6K1*(XVE-RNAi).

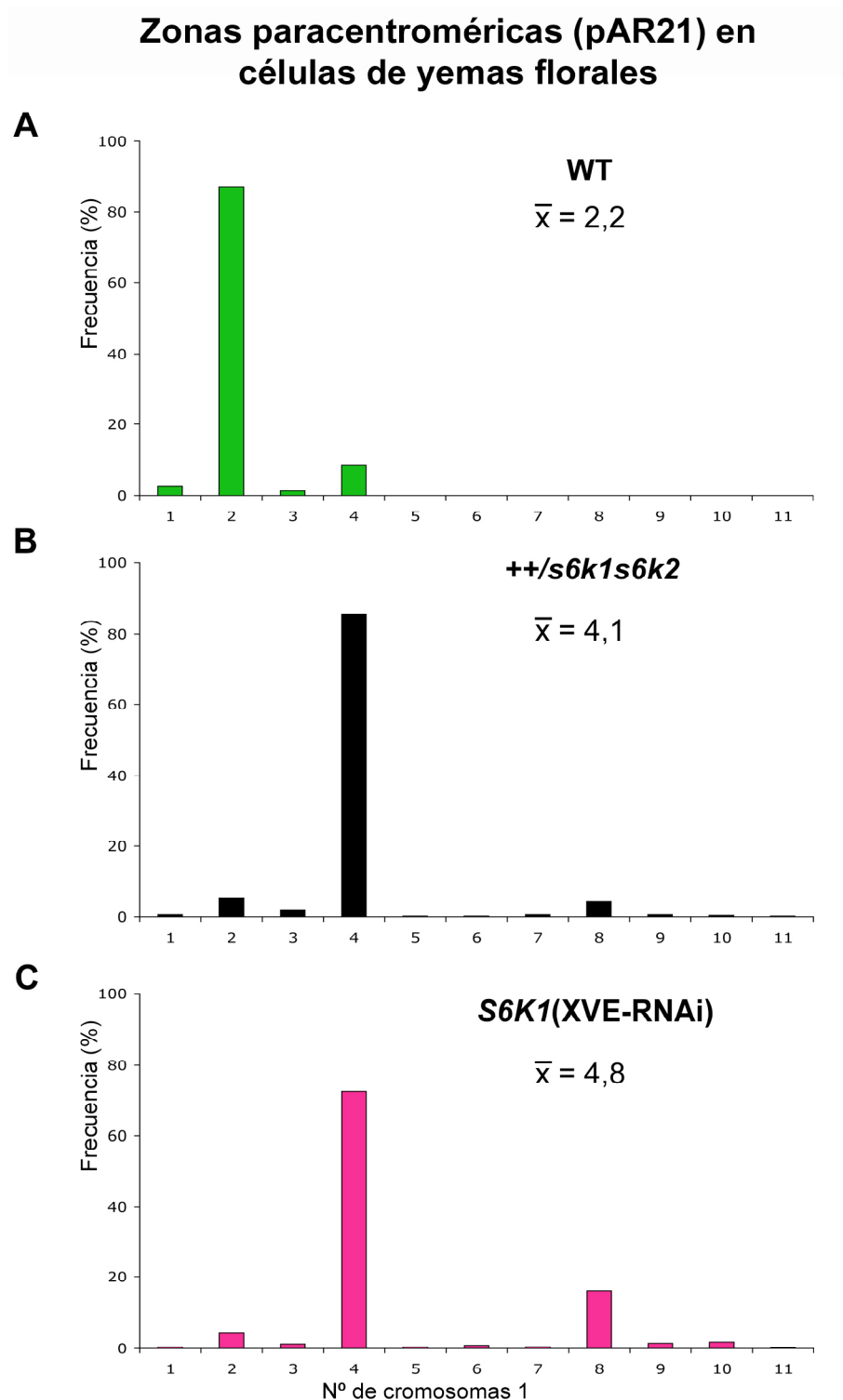


Figura 19: Niveles de zonas paracentroméricas puestas de manifiesto por FISH al emplear la sonda pAR21 que marca las zonas paracentroméricas de los cromosomas 1 en células de yemas florales **(A)** en plantas de tipo silvestre (WT), **(B)** en plantas heterocigotas ++/*s6k1s6k2* y **(C)** en plantas *S6K1*(XVE-RNAi).

El número de células diploides determinado a partir del número de señales de la sonda pAR21 en plantas WT es de 91,1% para células de hojas y de 92,3% en células de yemas florales. La ploidía con mayor frecuencia en células de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* corresponde a células tetraploides, con un 85,3% en células de la epidermis foliar y un 81,6% en células de yemas florales. En plantas *S6K1*(XVE-RNAi), la frecuencia de células tetraploides disminuyó en relación a la frecuencia observada en células de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2*. En células *S6K1*(XVE-RNAi) la frecuencia de células tetraploides es de un 72,1% en células de la epidermis foliar y de un 73,8% en células de yemas florales. Sin embargo, la frecuencia de células octoploides aumentó de 5,6% a 22,5% en células de hojas y de un 6,7% a un 21,5% en células de yemas florales (Figura 20).

El uso de esta sonda ofrece una visión más rápida y sencilla de los incrementos en el número cromosómico que se producen tanto en las plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* como en las plantas *S6K1*(XVE-RNAi). Adicionalmente, demuestra que el fenómeno de asociación centromérica se produce también entre los dos cromosomas 1, como por ejemplo ocurre en el WT (Figuras 18A y 19A). Los datos con esta sonda, confirman que la asociación entre centrómeros se incrementa con la ploidía. Por último, los cambios en la expresión de los genes *S6K* no parecen afectar a este proceso de fusión.

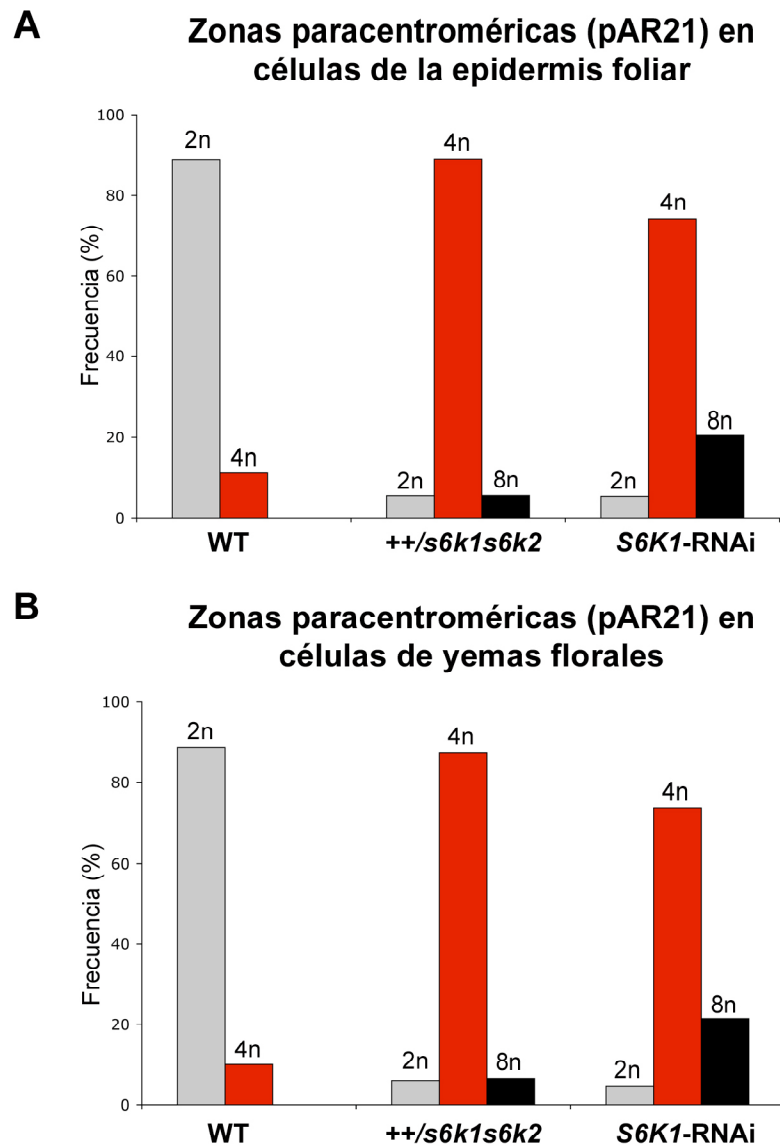


Figura 20: Niveles de ploidía puestos de manifiesto por FISH al emplear la sonda pAR21 que marca las zonas paracentroméricas de los cromosomas 1 **(A)** en células epiteliales de hojas y **(B)** en células de yemas florales en plantas de tipo silvestre (WT), en plantas de la línea heterocigota *++/s6k1s6k2* y en plantas *S6K1(XVE-RNAi)*. Estos datos corresponden a los valores desglosados en las figuras 18 y 19.

4. Papel de las cinasas S6K en células diferenciadas: estomas y tricomas foliares

4.1. Estomas

En la región de la epidermis foliar donde las células están en proliferación se observan también células ya diferenciadas, tales como estomas y tricomas, que coexisten con las células epidérmicas que todavía continúan en proliferación en la hoja aún en crecimiento. Los estomas son más abundantes en hojas de plantas heterocigotas $+/s6k1s6k2$ que en hojas de plantas WT (Figura 8A). Por ejemplo, mientras que se cuentan siete estomas concretamente en la imagen mostrada del WT, en la imagen de heterocigoto $+/s6k1s6k2$ se observa cómo este número se ha duplicado.

La formación de estomas y tricomas no se interrumpe al completarse la proliferación celular en el meristemo proximal de la hoja en crecimiento. Estas divisiones dan lugar a estructuras diferenciadas como los estomas que siguen apareciendo todavía entre las células ya diferenciadas que ocupan las posiciones más distales en relación al primordio foliar. Ello muestra que los cambios cuantitativos en las cinasas S6 no afectan al número de ciclos que corresponden a una hoja específica como la 3, aquí estudiada, de modo análogo a su falta de efecto en el número de ciclos que las células meristemáticas recorren hasta iniciar su diferenciación en dicha hoja.

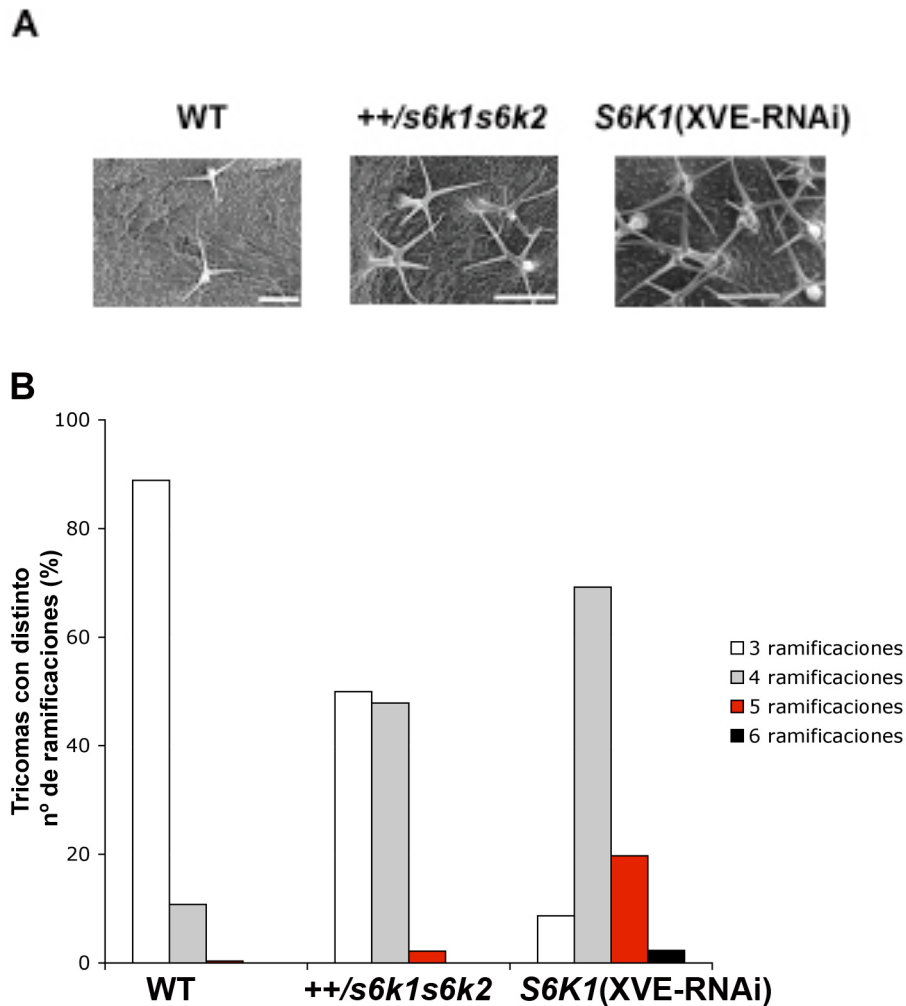


Figura 21: Incremento en el número de ramificaciones en los tricomas de hojas de las distintas plantas. **(A)** Micrografías electrónicas de barrido de tricomas de hojas (terceras hojas a 30 días de desarrollo) de plantas de tipo silvestre (WT), de plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y de plantas *S6K1(XVE-RNAi)*. Las barras corresponden a 200 μ m. **(B)** Frecuencia (%) de tricomas con 3, 4, 5 y 6 ramificaciones, de hojas en plantas de tipo silvestre (WT), en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y en plantas transformadas *S6K1(XVE-RNAi)*.

4.2. Tricomas

Como producto de las observaciones de hojas realizadas por microscopía electrónica de barrido, también constatamos que había diferencias en la morfología de los tricomas de hojas de plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* comparados con los tricomas de hojas de plantas silvestres (WT) (Figura 21A). Cuantificamos el número de ramificaciones o brazos que presentaban los tricomas en hojas de plantas silvestres (WT), en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y en plantas *S6K1(XVE-RNAi)* (Figura 21B). Los tricomas, tanto de hojas de plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* como de las plantas *S6K1(XVE-RNAi)* muestran un incremento en el número de ramificaciones con respecto a los de plantas silvestres (WT), su mayor incremento tiene lugar en las plantas transformadas *S6K1(XVE-RNAi)*. Así, mientras que el 88,9% de los tricomas de hojas de plantas WT presentan tres ramificaciones, el 50% de los tricomas de plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* presentan tres ramificaciones y el otro 50% presentan cuatro (47,9%) o cinco ramificaciones (2,1%).

Por el contrario, sólo el 8,7% de los tricomas de hojas de plantas *S6K1(XVE-RNAi)* presentan tres ramificaciones, casi el 70% tiene cuatro ramificaciones y en sus hojas se observan también tricomas con cinco (19,7%) y seis ramificaciones (2,4%). No se observaron tricomas de seis ramificaciones en hojas de plantas de tipo silvestre (WT) ni en hojas de plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* (Figura 21B).

Los ensayos FISH bien con sondas centroméricas totales pAL1b o paracentroméricas de los cromosomas 1, pAR21, no permitieron discriminar las zonas de hibridación cuando se trataba de núcleos de tricomas. Ello se debe quizás a el alto grado de diferenciación alcanzado por estas células, que correlaciona con su pared celular fluorescente. Este fenómeno se observó especialmente para las dos sondas aquí usadas. Sin embargo, cuando se usó DAPI para tratar de teñir los cromocentros no se producían nunca esas diferencias o, si las había, eran muy pequeñas. Por ello, en el caso concreto del tricoma, para determinar la ploidía de sus núcleos nos hemos de apoyar en el estudio del número de cromocentros, previa tinción con DAPI.

Como vemos en la figura 22, los tricomas de hojas de plantas de tipo silvestre (WT) presentan un número máximo de cromocentros igual a 10, aunque también hay asociación entre algunos de ellos, pero estas asociaciones no son tan frecuentes como en las células foliares en proliferación. Sin embargo, dichos cromocentros eran mayores que los de células ajenas al tricoma. Ello es una consecuencia de la politenía que cada cromosoma del complemento alcanza en dichos núcleos.

En el caso de plantas heterocigotas $+/s6k1s6k2$, así como en las plantas *S6K1*(XVE-RNAi), el número de cromocentros se incrementó ocasionalmente. Sólo en los núcleos de unos pocos tricomas se observó su incremento hasta 20, por lo que en estas condiciones se debe haber inducido previamente el paso de $2n$ a $4n$, en una poliploidización debida a endomitosis. Ello sugiere que la politenización es una opción que puede tomarse después de una primera inducción de endomitosis producido por la disminución en cinasas S6. Tanto el disparo del proceso de endo-replicación como el inductor de endomitosis ocurren en G2, como se mencionó antes, y ambos son alternativas al disparo canónico de la mitosis convencional (Figura 22).

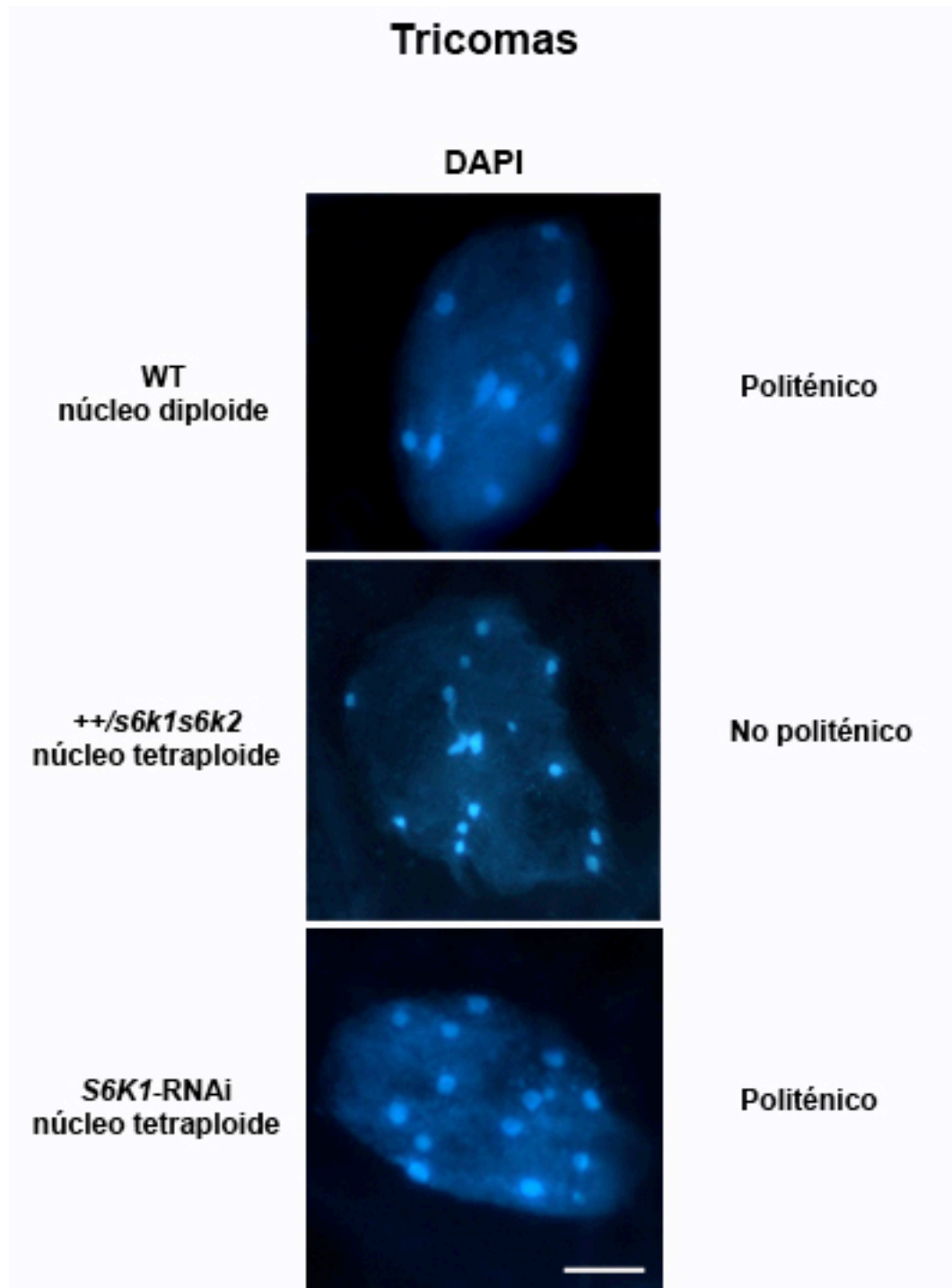


Figura 22: Incremento en el número y tamaño de cromocentros. Visualización por tinción con DAPI del número de cromocentros en el núcleo de un tricoma, en hojas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia en plantas de tipo silvestre (WT), en plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* y en plantas *S6K1*(XVE-RNAi). La barra corresponde a 20 μm y es válida para todas las imágenes.

5. Papel de las cinasas S6K en la diferenciación celular que tiene lugar durante el desarrollo floral

Las flores son órganos reproductivos diferenciados que se forman a partir de las yemas florales, su desarrollo completo tiene una duración de aproximadamente de 13,3 días (Smyth *et al.*, 1990). Observamos que las flores de plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y de plantas $S6K1(XVE-RNAi)$ eran de mayor tamaño que las de plantas WT (Figura 23), y eso a pesar de que la parte vegetativa aérea de la planta era menor en ellas que en las plantas silvestres (WT) (Figura 6).

Especialmente se observó un incremento en el número de pétalos en las flores de las plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$, alterando de forma notable la fórmula floral de la especie (Figura 23). Así, entre el 15 y el 20% de las flores de plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ tenían entre cinco y siete pétalos, mientras que las de plantas WT siempre presentaban cuatro pétalos.



Figura 23: Número de pétalos y su tamaño. (A) Flores a 60 días de desarrollo de plantas de tipo silvestre (WT). Las de plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y $S6K1(XVE-RNAi)$ muestran un incremento en el número de pétalos. Las barras corresponden a 0,5 mm.

6. Análisis de anteras y silicuas

Dada la alta frecuencia de semillas no viables en plantas de heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y en las $S6K1(XVE-RNAi)$ y, por otra parte, dadas las anomalías detectadas en la segregación de resistencia:sensibilidad a higromicina en los cruzamientos en los que intervienen el heterocigoto $++/s6k1s6k2$ y el tipo silvestre, estudiamos la morfología de anteras (Figura 24A) y de silicuas (Figura 24B), en ambos tipos de plantas. Se utilizó la tinción Alexander para estudiar la frecuencia de polen viable tanto en el heterocigoto $++/s6k1s6k2$ como en el $S6K1(XVE-RNAi)$. Observamos que tanto las anteras como las silicuas de las plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y, así mismo, las de las $S6K1(XVE-RNAi)$ (datos no mostrados) presentaban un desarrollo menor que las de plantas WT y un número menor de granos de polen que las plantas silvestres. Esto correlaciona con una reducción en la viabilidad del polen de estas plantas (Figura 24C).

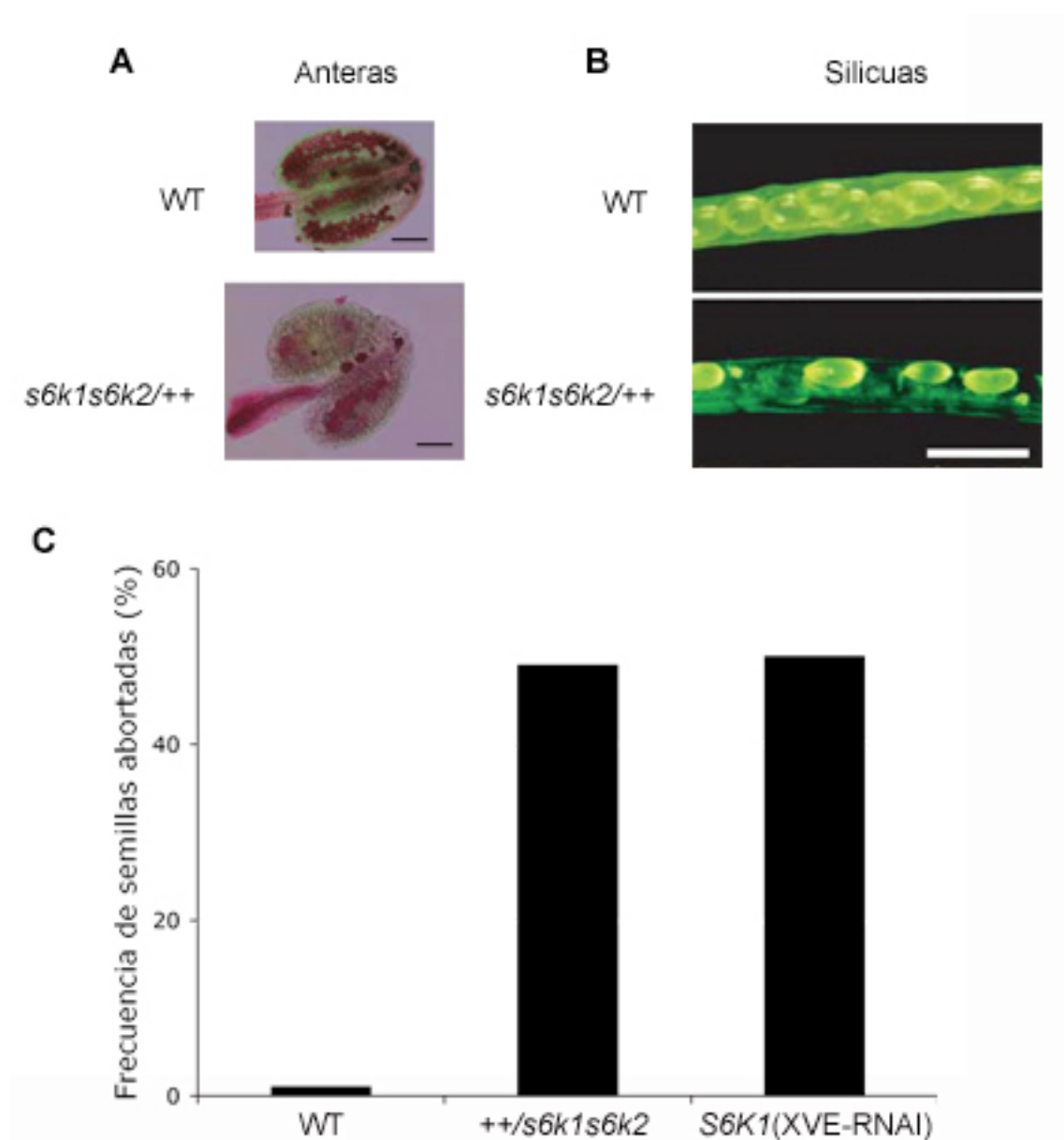


Figura 24: Caracterización de anteras y silicuas. **(A)** Anteras de plantas de tipo silvestre (WT) y de plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2*, teñidas con la tinción Alexander. Las barras corresponden a 50 μ m. **(B)** Disección de silicuas de plantas de tipo silvestre (WT) y de plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2*. La barra corresponde a 1 mm y aplica a ambas imágenes. **(C)** Distribución de frecuencias de semillas abortadas (no viables) (%) en plantas de tipo silvestre (WT), en plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2* y en plantas *S6K1(XVE-RNAi)*.

7. Viabilidad de las semilla

En el heterocigoto $+/s6k1s6k2$ se observó un importante incremento en la frecuencia de polen inviable en las anteras, que tiene como consecuencia del aborto temprano del 49% de las semillas en sus silicuas ($n = 750$), mientras que en las plantas WT sólo un 1% de sus granos de polen eran inviables (Figura 24C). Es posible que el polen derivado de la autofecundación de plantas heterocigotas $+/s6k1s6k2$ pueda tener una baja capacidad de fertilización y que esto provoque una fecundación tardía, dando lugar a una reducción de doble heterocigotos en la progenie viable.

También estudiamos la viabilidad de los granos de polen en plantas *S6K1*(XVE-RNAi) inducidas. La frecuencia de granos de polen no viable en ellas fue del 50% en relación a la que contamos en las plantas WT, una proporción semejante a la hallada en las plantas heterocigotas (49%) (Figura 24C).

8. La ploidía de gametofitos masculinos, determinada por FISH

Estudiamos también la ploidía de gametofitos masculinos por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando las sondas pAL1b (centrómeros totales) y pAR21 (zona paracentromérica del brazo corto de los cromosomas 1) (Figura 5, repetida a tamaño reducido encima de la leyenda de la Figura 25). La localización por FISH fue realizada en plantas de tipo silvestre (WT), en plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ y en plantas *S6K1*-RNAi. En la figura 25, se observa una célula del gametofito masculino diploide de una planta WT que se encuentra en metafase I y que presenta sus cinco pares de cromosomas teñidos con DAPI, alineados en la placa metafásica (Figura 25a). La sonda pAL1b nos permite discernir mejor los 10 centrómeros en el núcleo (Figura 25d), mientras que la sonda pAR21 nos permite identificar la regiones paracentroméricas correspondientes a los cromosomas 1 (Figura 25g). La figura 25j muestra la misma célula hibridada a la vez con ambas sondas. Es de notar que estos cromocentros teñidos con DAPI corresponden a los centrómeros observados en interfase en células somáticas (Figura 10e, i).

En la figura 25b observamos una célula de un gametofito masculino de una planta heterocigota $++/s6k1s6k2$, que se encuentra en anafase I. La tinción con DAPI revela la presencia de veinte cromocentros, 10 en cada polo, lo cual indica que se trata de la anafase de una célula tetraploide. La sonda pAL1b nos permite ver con mayor definición los centrómeros (Figura 25e), separados en dos grupos de diez, mientras que la sonda pAR21 nos indica la posición de las regiones paracentroméricas de los cuatro cromosomas 1 (Figura 25h). Estas regiones paracentroméricas son adyacentes a los centrómeros de los cromosomas 1 como se observa en la figura 25k al realizar el ensayo FISH con ambas sondas en la misma célula. Los resultados fueron similares en células del gametofito masculino de las plantas *S6K1*-RNAi.

En la diacinesis I mostrada en la tercera columna se observa una célula tetraploide, con 20 cromocentros teñidos por DAPI (Figura 25c), que corresponden a 20 centrómeros localizados con la sonda pAL1b (Figura 25f), siendo cuatro los centrómeros que corresponden al número de cromosomas 1 presentes en este

núcleo tetraploide (Figura 25 i) detectados con la sonda pAR21. La figura 25 l muestra la misma célula hibridada con ambas sondas.

Las fases de la meiosis en las que es posible determinar la ploidía, nos mostraron que ésta era siempre diploide en el WT, mientras que tanto en el heterocigoto $++/s6k1s6k2$ como en el *S6K1*(XVE-RNAi) algunas de las meiosis observadas fueron tetraploides.

Figura 25: Localización por DAPI de cromocentros y por FISH de todos los cromosomas y paracentroméricas de los cromosomas 1 en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Primera columna (a, d, g, j): célula diploide en metafase I de planta WT.

Segunda columna (b, e, h, k): célula tetraploide en anafase I de planta heterocigota $+/s6k1s6k2$.

Tercera columna (c, f, i, l): célula tetraploide en diacinesis I de planta *S6K1*(XVE-RNAi).

Primera fila: localización por DAPI de cromocentros.

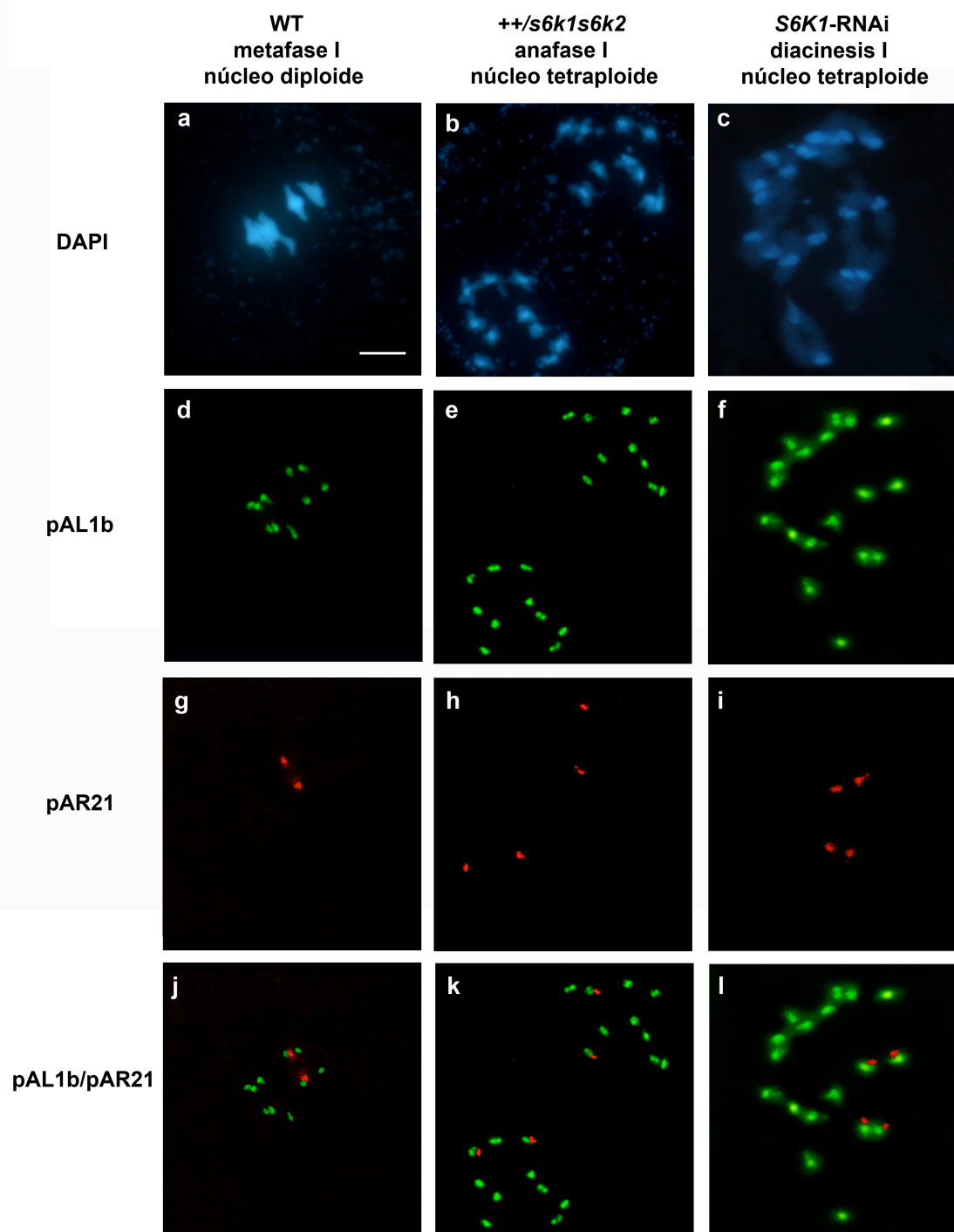
Segunda fila: FISH con sonda pAL1b, que marca las zonas centroméricas todos los pares de cromosomas, en las mismas células.

Tercera fila: FISH con sonda pAR21, sonda específica que marca la zona paracentromérica del brazo corto de los cromosomas I.

Cuarta fila: FISH con sondas pAL1b y pAR21.

La barra en **a** corresponde a 6 μ m y es válida para todos los paneles.

Meiosis en células del gametofito masculino



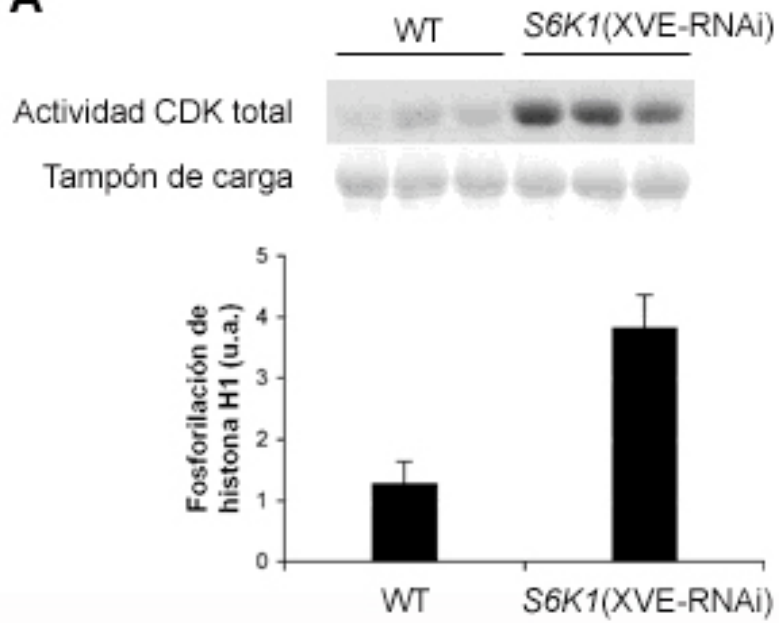
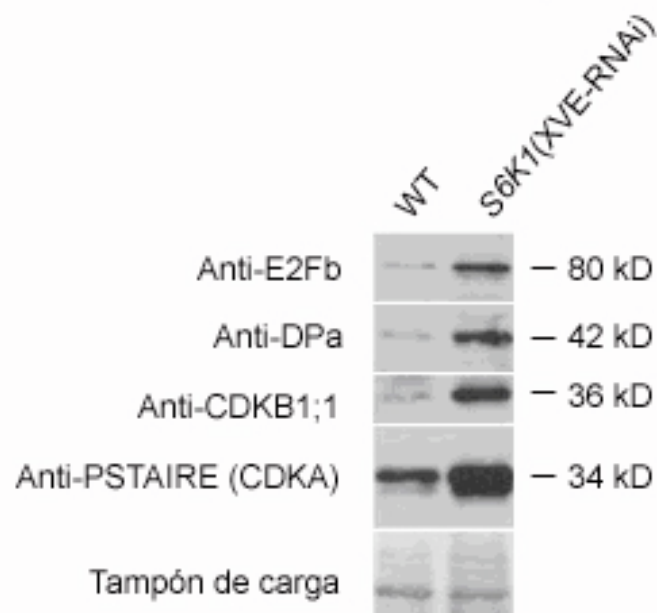
9. La presencia de las cinasas S6K en protoplastos reduce la actividad fosforilativa de CDKs sobre la histona H1

Las células en proliferación activa se caracterizan por niveles altos en la actividad de CDKs (Magyar *et al.*, 2005). Para determinar si una reducción en los niveles de las cinasas S6K podría modificar la actividad total de CDKs medimos, en protoplastos, la actividad de CDKs purificadas mediante la unión de estas proteínas a bolitas de sefarosa cubiertas por proteína p13^{suc1}. La actividad de CDKs total se midió por el nivel de fosforilación de la histona H1 (Figura 26A, panel superior). Como muestra la autorradiografía, la fosforilación de la histona H1 es mayor en los protoplastos transfectados *S6K1*(XVE-RNAi), en los que ha disminuido la expresión de las cinasas S6K. El histograma de la figura 26A muestra que, de hecho, dicha actividad es tres veces mayor en los protoplastos en los que los genes *S6K* han sido silenciados por RNAi que en protoplastos en los que dicha cinasa se expresa sin restricción alguna, como ocurre en los protoplastos de plantas WT. Estos datos sugieren que las cinasas S6K actúan , en condiciones fisiológicas, como proteínas represoras de la fosforilación de histona H1 por CDKs.

Figura 26: Análisis inmunobiológico por Western blot de proteínas involucradas en el control del ciclo celular en protoplastos.

(A) Detección de la actividad fosforilativa de CDKs en histona H1, tanto en células en suspensión de *Arabidopsis* de tipo silvestre (WT) como en las transfectadas con la construcción *S6K1*(XVE-RNAi), tres días después del tratamiento. Panel superior: autorradiografía que muestra un incremento en la fosforilación por CDKs de la histona H1 cuando la expresión de la cinasa S6K1 ha sido silenciada por RNAi. Se muestran los resultados de tres experimentos sucesivos. Panel inferior: cuantificación expresada en unidades arbitrarias de la señal de fosforilación por CDKs de la histona H1.

(B) Detección de los niveles de proteínas E2FB, DPA, CDKB1;1 y CDKA (PSTAIRE) en protoplastos de *Arabidopsis* de tipo silvestre (WT) y en protoplastos transfectados con la construcción *S6K1*(XVE-RNAi), tres días después del tratamiento del cultivo en suspensión.

A**B**

10. Los genes S6K son represores de la expresión de proteínas que controlan específicamente el G2

Estudiamos los efectos a corto plazo del silenciamiento de los genes *S6K* sobre los niveles de proteínas del ciclo celular E2Fb, DPa, CDKB1;1 y CDKA (PSTAIRE), en cultivos de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Tres días después de la transfección, la disminución de la expresión de los genes *S6K* debida a RNAi tuvo como resultado un incremento notable en los niveles de las proteínas activadoras de la progresión de la célula a través del ciclo proliferativo. Así se incrementaron ambos componentes del factor de transcripción heterodimérico E2Fb-DPa (Figura 26B). Es de resaltar también que tanto CDKA (la cinasa que conserva el motivo PSTAIRE) como la cinasa CDKB1;1, que tiene un motivo diferente (PPTAIRE), es típica de plantas y específicamente controla la transición de G2 a mitosis, se encuentran fuertemente incrementadas en ausencia de la actividad transcriptora del gen *S6K1*.

El incremento de las cinasas CDKB1;1 en las células en proliferación de esta planta que se produce en ausencia de las cinasas S6K puede deberse bien a una hiperactivación de estas cinasas, a una acumulación de células en la etapa G2 del ciclo proliferativo (es decir a un alargamiento de esta etapa G2), a una mezcla de ambos procesos o incluso a un incremento en la vida media, siempre muy corta, de la ciclina CDKB1;1 que controla la transición de G2 a mitosis. El que los valores de los componentes del heterodímero que constituyen el factor de transcripción E2Fb-DPa se encuentren incrementados sugiere que la expresión de los genes activados por este factor dimérico se estimula (de-represión) en ausencia de las cinasas S6K. En este caso, las cinasas S6K parecen tener una función represora de la transcripción específica de algunos de los genes que normalmente se expresan en la etapa G2 del ciclo celular, en condiciones WT.

11. Inhibición del promotor del gen *CDKB1;1* por las cinasas S6K

Para valorar la actividad del promotor del gen *CDKB1;1*, típico de las células vegetales y cuya expresión es característica de G2, transfectamos protoplastos de *Arabidopsis* con el promotor del gen *CDKB1;1* (WT) fusionado al gen reportero GUS que codifica la enzima reportera β -glucuronidasa. En paralelo, transfectamos protoplastos control con una versión mutada del promotor del gen *CDKB1;1* (Mut) que carecía del sitio de unión a E2F. Los ensayos GUS se llevaron a cabo tres días después de la transfección (Figura 27), cuando el cultivo celular se encontraba ya en fase estacionaria (An *et al.*, 2003). La actividad del promotor del gen *CDKB1;1* en células en las que se había frenado la producción de las cinasas S6K se incrementaba en relación al control. Estos resultados indican que en células en fase estacionaria, es decir que han dejado de dividirse, S6K reprime el promotor de genes como *CDKB1;1* que son dependientes del factor de transcripción E2Fb-DPa. Estos datos sugieren también que las cinasas S6K en las plantas WT evitan la entrada de estas células a mitosis hasta que un cierto requisito se haya cumplido. Las cinasas S6K serían, pues, proteínas de las rutas de chequeo que en paralelo controlan la idoneidad de los distintos procesos para hacer seguras las consecuencias del paso de G2 a mitosis, regulando específicamente dicha transición irreversible a mitosis.

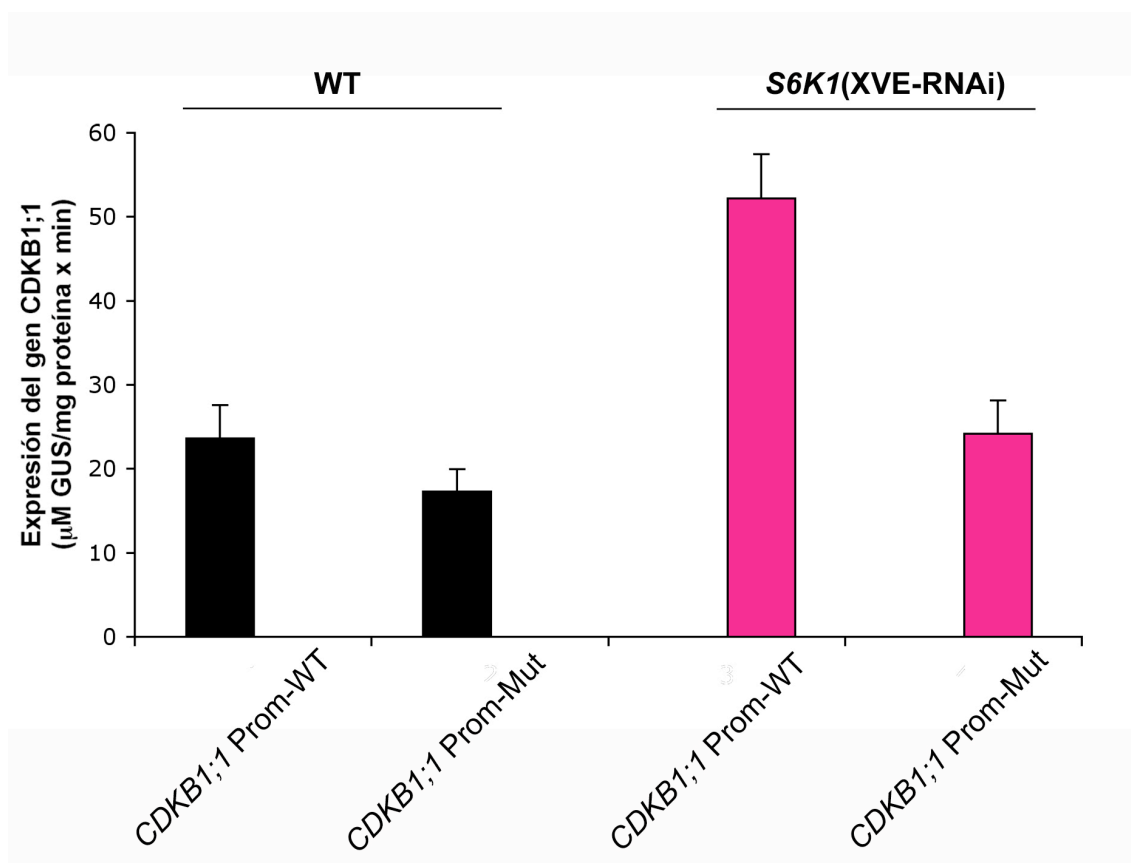


Figura 27: Expresión del gen *CDKB1;1* en protoplastos, tanto en células control (WT) como en protoplastos transformados con la construcción *S6K1(XVE-RNAi)*. Las células se encontraban en fase temprana de crecimiento estacionario, tres días después de aplicar el tratamiento. Es evidente que la expresión del gen *CDKB1;1* se incrementa en plantas *S6K1(XVE-RNAi)* en relación a las plantas WT, especialmente cuando el promotor es el silvestre.

Prom-WT, promotor de *CDKB1;1* de tipo silvestre; Prom-Mut, promotor de *CDKB1;1* cuyo sitio consenso de unión a E2F fue mutado. Ambos se fusionaron con el gen reportero GUS.

DISCUSIÓN

1. Las cinasas S6Ks aseguran el desarrollo normal de la parte aérea de la planta

Los estudios llevados a cabo a lo largo de esta tesis acerca de las funciones reguladoras de las proteínas S6Ks en *Arabidopsis thaliana* mostraron que cuando los dos genes *AtS6K1* y *AtS6K2* están mutados, no existe descendencia homocigótica viable. Las cinasas S6Ks parecen ser, pues, esenciales para la viabilidad de las células de estas plantas, observación que concuerda con el fenotipo letal de las mutaciones *s6k1^{-/-}s6k2^{-/-}* en ratón (Pende *et al.*, 2004).

Del mismo modo que ocurre en ratón y en *Drosophila* (Montagne *et al.*, 1999), la reducción de los niveles de S6Ks da lugar fenotipos discernibles del de los individuos con niveles normales de estas cinasas. En *Arabidopsis*, las plantas heterocigotas *+/+s6k1s6k2* mostraron un bajo crecimiento, semi-enanismo y semi-esterilidad, como se vio en la figura 7.

2. La organogénesis como interacción entre proliferación y diferenciación

La organogénesis implica la regulación de la división celular y la expansión celular posterior que caracteriza la diferenciación (Irish, 2008). En plantas, el desarrollo es -en su mayor parte- post-embrionario, a diferencia de lo que ocurre en animales. Los nuevos órganos, tales como raíz, tallo, hojas y flores se originan de las nuevas células que se van incorporando al tejido como consecuencia de la proliferación de sus células meristemáticas. Sin embargo, el crecimiento de un órgano depende principalmente de la capacidad de elongación de las nuevas células, una vez que éstas abandonan proliferación. Por ejemplo, en la hoja, la diferencia en tamaño entre las células meristemáticas y las ya diferenciadas puede alcanzar dos órdenes de magnitud (Donnelly *et al.*, 1999). Este patrón de desarrollo de los órganos de la planta resulta

especialmente claro en la raíz que, al crecer principalmente de forma unidireccional presenta el meristemo en su extremo, seguido de una región de elongación, para alcanzar finalmente un tamaño final en la parte ya diferenciada (López-Sáez *et al.*, 1975; Beemster *et al.*, 1998) como viene en la figura 28 (tomada de Winter *et al.*, 2007). Por el contrario, en las hojas, las células en diferenciación se encuentran dispersas entre en las que se hallan todavía en proliferación.

La proteína S6K1 presenta una distribución bastante homogénea, tanto en células en proliferación como en células en elongación en la raíz. Por el contrario, la proteína S6K2 se acumula preferentemente en las zonas en que el alargamiento de las células es extremo, en la zona de diferenciación.

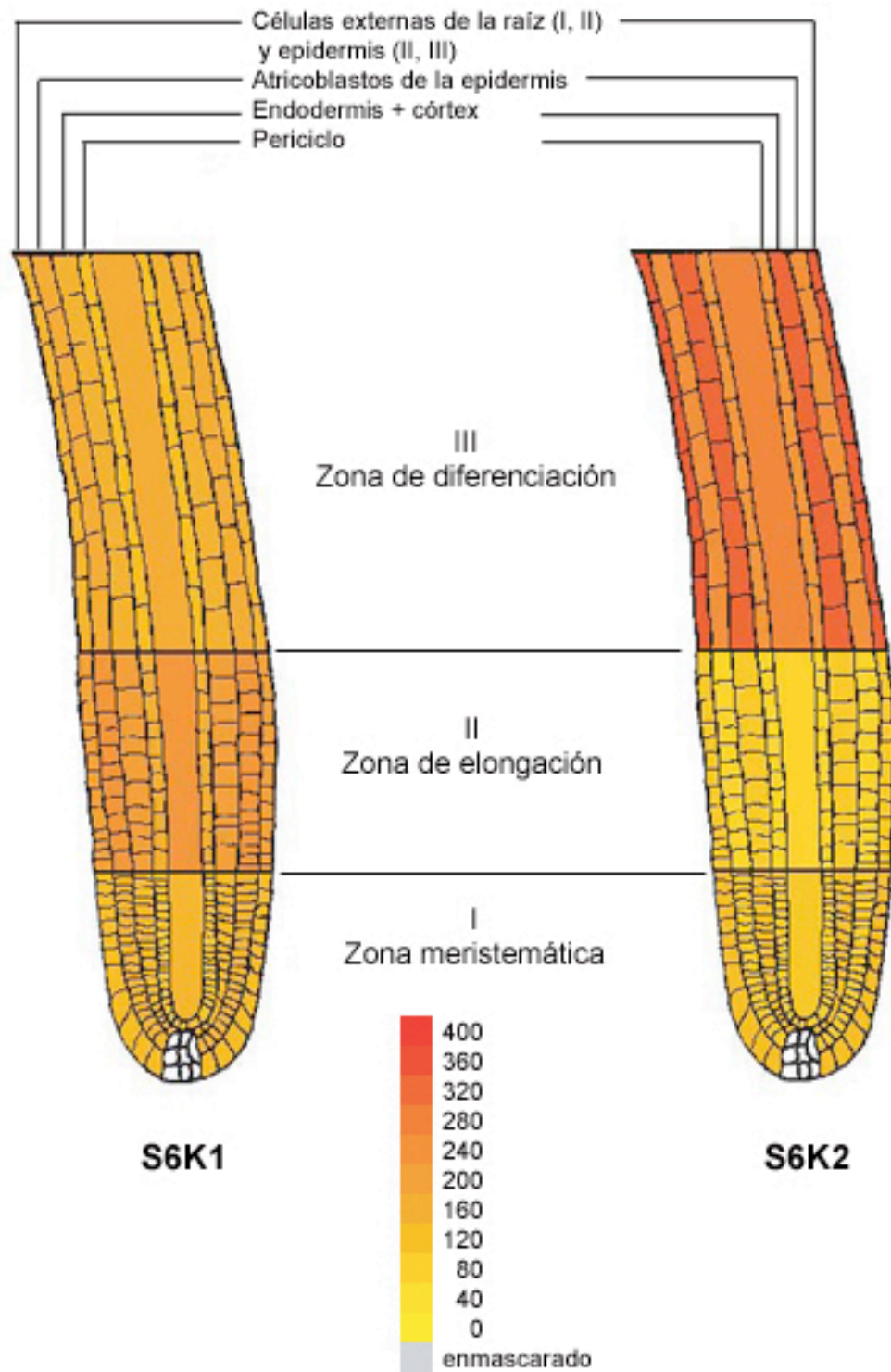


Figura 28: Patrón de expresión de *S6K1* (At3g08730) y *S6K2* (At3g08720) en raíz usando eFP-browser de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (Winter *et al.*, 2007). Los valores indicados corresponden a los valores de la señal Affimatrix.

3. Regulación positiva y negativa del ciclo celular

3.1. Las rutas de chequeo

Existen dos formas alternativas de controlar el ciclo celular y ambas implican una parada en la progresión de la célula hacia una etapa más avanzada de su programa de ciclo. La diferenciación crucial entre ambos tipos de regulación está en el hecho que si la interrupción del ciclo celular es permanente, la parada se debe a la carencia de un regulador positivo del ciclo celular que es un requisito indispensable para que tenga lugar un suceso posterior. En cambio, si la parada es sólo transitoria, entonces esta parada se debe a la actividad de un regulador negativo del ciclo celular. Si lo que falta es un regulador negativo del ciclo celular, la velocidad de progresión del ciclo celular se acelera al disminuir dicho inhibidor, después de una parada corta previa.

La proliferación de las células eucarióticas viene regulada en las transiciones más importantes entre fases del ciclo celular. El paradigma de dichas transiciones son el G1/S y G2/M aunque no son las únicas. La célula, antes de esas transiciones, tiene unos mecanismos de chequeo que controlan distintos parámetros y valoran su idoneidad para permitir que la etapa siguiente del ciclo sea segura. Aunque se hable de una ruta de chequeo en G2, existen varias rutas paralelas, como el tamaño mínimo, que el DNA no tenga daño, que la maquinaria de síntesis de proteínas esté preparada, etc. Cada una de estas rutas produce señales anti-mitogénicas hasta que el requisito que controla cada una de ellas se ve cumplido de forma que la célula no se anticipe a una entrada indebida en una etapa posterior.

La disfunción de cualquier proteína represora de proliferación celular permite, después de un tiempo, que la célula entre en la fase siguiente del ciclo celular, aún cuando no se encuentra preparada para llevar a cabo con éxito dicha etapa del ciclo. Este proceso es conocido como “adaptación” a rutas de chequeo.

3.2. La adaptación a la parada inducida por rutas de chequeo

La producción en exceso de señales mitogénicas, es decir, de señales que favorecen la entrada en mitosis hará, por ejemplo, que células que aún no han alcanzado un mínimo tamaño mitótico salten prematuramente a mitosis. La demostración experimental de este fenómeno se basa en el adelantamiento de la entrada en mitosis al inducir la expresión ectópica de una de las ciclinas mitóticas (Weingartner *et al.*, 2003).

Las S6Ks se comportan como proteínas de chequeo que ejercen una represión en la entrada en mitosis hasta que ciertos requisitos se completan en G2. En el caso de las cinasas S6, su carencia induce una entrada prematura de las células G2 en mitosis (adelantamiento al “inhibir un inhibidor”). Las células entran en mitosis pero realizan una mitosis anormal. En ella se produce la segregación de los cromosomas hermanos pero no se divide la célula, obteniéndose una célula tetraploide al final de la fase M del ciclo celular (De la Torre, 2005). En realidad, la falta de coordinación que se produce entre el ciclo de condensación cromosómico y la formación de fragmoplasto en el ciclo microtubular es responsable de la inducción de endomitosis (Weingartner *et al.*, 2004), como veremos más adelante. S6K1, pues, retrasa en las células de plantas WT la transición de G2 a M hasta que todas las condiciones óptimas para la realización de una mitosis convencional se hayan cumplido. Nuestros hallazgos nos permiten afirmar que S6K1 es una proteína represora del ciclo celular, que participa en el punto de chequeo G2/M, en *Arabidopsis thaliana*.

El carácter inhibitorio de funciones relacionadas con la progresión del ciclo celular se pone de manifiesto, para el caso de las cinasas S6Ks, si tenemos en cuenta que la inhibición de un inhibidor produce, obviamente, un efecto acelerador en el ciclo celular, en este caso concreto un acortamiento de la etapa G2. La consecuencia de ello será la disminución del tamaño medio de sus células, ya que una de las funciones que son objeto de chequeo de las células en G2 comprende la determinación de si la célula ha alcanzado el tamaño mínimo requerido para iniciar mitosis, como el grupo de Nurse puso de manifiesto que ocurría en los mutantes *wee* (enano, en escocés) de la

levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Nurse y Thuriaux, 1980). Eso es lo que se observa también en las células de la epidermis foliar (Figura 8).

Dado que el número de células en las hojas, a las dos semanas de aparición de la hoja, era semejante en los tres tipos de plantas, el número de ciclos que la célula recorre hasta ese momento del desarrollo foliar no ha sufrido variaciones significativas en respuesta a la disminución de las cinasas S6. Es decir, en el caso de que haya diferencias en la duración media de cada ciclo, éstas no deben alcanzar diferencias que superen a un solo ciclo.

El estudio sistemático del genoma de *Drosophila* por RNAi en células en cultivo, acoplado con un barrido del ciclo celular identificó los componentes de señalización TOR, PDK1, S6K y corriente abajo los efectores que controlan tanto el tamaño, como el ciclo celular (Bettencourt-Dias *et al.*, 2004; Bjorklund *et al.*, 2006; Guertin *et al.*, 2006). El silenciamiento en *Drosophila* de *Rbfl*, homólogo de *RB* en mamíferos, da lugar a un fenotipo de crecimiento celular y de proliferación similar al que se obtiene al silenciar los genes de señalización en la vía TOR (Bjorklund *et al.*, 2006). La conservación general de estos mecanismos sugiere que el papel de la vía TOR-S6K en la regulación de la proliferación celular puede estar relacionada también con las S6Ks de plantas, aunque con algunas características que pueden ser únicas en éstas últimas (Fingar y Blenis, 2004).

En las condiciones en que estudiamos el papel de las S6Ks es de esperar que por sus relaciones con los factores de transcripción que controlan las dos transiciones conocidas entre las fases sucesivas de ciclo celular (G1 a S y G2 a mitosis), ambas zonas de chequeo están canceladas. Como ya es conocido, cuando la falta de nivel energético en la célula activa el primero de los chequeos se frena, por lo tanto, la entrada en S. Sin embargo, la caducidad de cualquier punto de chequeo lleva a la entrada en S y la llegada al segundo de los puntos de chequeo, el G2, que hará que dicho chequeo parezca más eficaz que el que se produce en la célula WT en ausencia del estrés adicional.

En ese G2, después de una parada por chequeo se produce siempre la

entrada indebida en mitosis. Esa adaptación al chequeo G2 pone de manifiesto cómo uno de los requisitos que debería haber cumplido para entrar en mitosis es la inducción del ciclo microtubular de forma que queda asegurada la coordinación de este ciclo con el de condensación cromosómica (Utrilla *et al.*, 1993). Dicho de otra manera, en lugar de completarse una mitosis normal se induce una endomitosis, en la que sin necesidad de existir un huso mitótico las cromátidas hermanas llegan a separarse como ocurre, por ejemplo, en mitosis interrumpidas por el uso de colchicina, el agente clásico que previene el ensamblaje de tubulina y pone en marcha el punto de chequeo del huso (Giménez-Abián *et al.*, 2002).

4. La cinasa S6 como proteína de chequeo en proliferación celular

Las cinasas S6 se comportan, pues, como proteínas de chequeo, al menos en G2. Es decir, inicialmente son capaces de inhibir la actividad CDK-ciclina que lleva a la entrada en mitosis.

La división celular es un proceso clave en el crecimiento y desarrollo de la organogénesis en plantas, procesos que, como acabamos de decir, ocurren de forma coordinada. Muchas de las proteínas reguladoras de proliferación, tales como las CDKs, las ciclinas y los inhibidores de ciclinas son muy numerosas en plantas. Las cinasas dependientes de ciclina (CDKs) fosforilan a ciertas proteínas sustrato que participan en los puntos de transición claves, tales como los que permiten la transición de G1 a S y la de G2 a M, estimulando la iniciación de replicación y mitosis, respectivamente.

Mientras que en levaduras existe una sola CDK y son las distintas ciclinas las que proporcionan a dicha CDK su especificidad de su sustrato así como controlan el momento de su activación, en plantas, así como en animales. Las CDKs se sintetizan también en momentos precisos del ciclo celular (Joubès *et al.*, 2000; Tsakraklides *et al.*, 2002; Vandepoele *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2005), aunque no comparten con las ciclinas su exquisita labilidad que las hace mantenerse activas sólo en una ventana muy pequeña del ciclo celular induciendo la progresión de la célula hacia

etapas más tardías en la secuencia G1-S-G2-M. Ambos componentes del heterodímero CDK-ciclina y no sólo las ciclinas introducen el control transcripcional en la interfase de la célula vegetal.

4.1. Las cinasas S6Ks reprimen la transcripción de genes que controlan la progresión del ciclo celular en protoplastos

En protoplastos en los que se silenció el gen *S6K1* mediante un RNA de interferencia observamos que se produce un aumento de la actividad CDK total a respuesta a corto plazo (Figura 26A). Este hecho también se correlaciona con estudio del nivel de fosforilación de la histona H1 por parte de estas CDKs. Observamos que la actividad fosforilativa de CDKs aumentó tres veces en protoplastos en los que la expresión de S6Ks se había inhibido (plantas *S6K1*(XVE-RNAi)), en relación al observado en protoplastos de tipo silvestre (WT). La actividad cinásica asociada a la fosforilación de H1 alcanza un pico máximo en G2-mitosis, lo que está de acuerdo con el importante incremento en condensación de la cromatina dependiente de fosforilación que se produce en esta fase (Porceddu *et al.*, 2001). Este incremento en la actividad fosforilativa de las CDKs corresponde a lo que se conoce como adaptación a chequeos, en este caso en concreto, al chequeo G2.

Más aún, los niveles de expresión de proteínas involucradas en el ciclo celular, como E2Fb, DPa, CDKB1;1 y CDKA en protoplastos (Figura 26B) se incrementaban. E2Fb y DPa son factores de transcripción que forman un heterodímero (que favorece la síntesis de mRNAs fase-específicos en el ciclo celular), tanto en células animales como en células de plantas (Albani *et al.*, 2000; Kosugi y Ohashi, 2002; Inzé y De Veylder 2006). Las células en proliferación tienen dos picos de máxima síntesis de proteínas: durante G1 (antes de entrar en S) y durante G2 (antes de entrar en M). Por lo tanto, un aumento en el nivel de expresión de los factores de transcripción necesarios para la síntesis de proteínas es congruente con el hecho de que las células en G2 se encuentran en una fase importante para la transición irreversible a mitosis, la etapa inmediatamente posterior al G2, dentro de la proliferación celular.

Normalmente retinoblastoma se encuentra asociado a los factores de transcripción impidiendo su actividad durante G1. La fosforilación de RBR1 hace que E2Fb quede libre y activo y pueda formar el heterodímero E2Fb/DPa. De esta manera se activa la transcripción de mRNAs correspondientes a proteínas que activan la iniciación de replicación. De forma análoga, en G2 se produce una activación de la transcripción para hacer posible la entrada en mitosis. Aunque el control de la proliferación celular por la ruta RBR1-E2F sería eficaz aunque sólo ocurriera una vez por ciclo (por ejemplo, al controlar la entrada de G1 a S), lo cierto es que la célula siempre cuenta con un segundo control redundante, para la transición de G2 a mitosis. En ésta también se da una interacción parecida.

Generalmente, el control de entrada en replicación es más restrictivo que el control de entrada en mitosis, sobre todo en animales y en la levadura *S. cerevisiae*. En plantas y en *S. pombe*, el control en G2 es comparativamente más restrictivo que en G1. Esto es especialmente cierto cuando el primero ha sido ya activado por un estrés específico y dicho control ha sufrido la llamada “adaptación a chequeos” en la que la célula salta dicho control sin que se cumplan los requisitos de transcripción y traducción correspondientes (De la Torre, 2005). Por ello, el mayor nivel de restricción de la parada G2 por chequeos puede ser la consecuencia natural de la previa adaptación al chequeo G1, con lo que las células llegan a G2 con más fallos que los inicialmente presentes en G1.

Debemos tener en cuenta que todas las células eucarióticas cuentan con controles en G1 y en G2. Sin embargo, ocurre que los controles en G1 son más restrictivos, eficaces o fuertes en el caso de células de mamíferos y en *Saccharomyces cerevisiae* que en plantas. En células animales, el punto de chequeo más importante del ciclo celular es la transición de G1 a S, en cambio, en células vegetales el punto de chequeo crítico es la transición de G2 a M.

Una diferencia similar en el grado de restricción de estas regiones de chequeo de proliferación se observó por primera vez en levaduras. Hartwell y colaboradores, en 1974, constataron que en *Saccharomyces cerevisiae* el punto de regulación más importante para esta levadura era el momento de transición entre la fase G1 y la fase S del ciclo celular. Por el contrario, los trabajos realizados por Nurse y

colaboradores, en 1979, demostraron que en *Schizosaccharomyces pombe* el punto de control más importante en el ciclo celular ocurría en la transición de G2 a M.

Una vez que se produce la adaptación a chequeos, como es de esperar, el silenciamiento de *S6K* no impide ya la activación del promotor de *CDKB1;1* en células previamente paradas en G2 por el bloqueo transitorio, debido a la activación de la ruta de chequeo, bloqueo que depende de la presencia de un elemento funcional de unión a E2F (Figura 26B). A tiempos más largos, también se observaron niveles elevados de las proteínas activadoras de la progresión del ciclo celular tales como E2Fb y DPa, y de la actividad enzimática de las CDKs (CDKA y CDKB1;1), tanto en las plantas silvestres de *Arabidopsis* como en las células con niveles reducidos de S6K en las que ya se ha agotado o, dicho de otro modo, ha caducado la capacidad del bloqueo por chequeo de la progresión de la células en G2 hacia mitosis. El silenciamiento de *S6Ks* tiene, pues, como resultado más tardío la estimulación de la actividad del promotor de *CDKB1;1* a un grado comparable al que se produce a tiempos medios después de inducido el silenciamiento de *RBR1*, un represor bien conocido de la expresión génica dependiente de E2F (Du y Pogolier, 2006).

Datos previos, que se han dejado fuera de esta tesis, han puesto de manifiesto que S6K1 interactúa con RBR1 y E2Fb, y que estas proteínas están presentes en el mismo complejo. Además, observamos que la cinasa S6K1 fosforila RBR1 en su centro activo, situado en la región bolsillo de RBR1. Cabe destacar que tanto S6K1 como S6K2 contienen un motivo de tipo LxCxE (LVxCxE), el cual puede mediar la interacción de S6K observada con RBR1, pero esto queda aún por confirmar (Singh *et al.*, 2005). Esos datos previos indican la fosforilación de RBR1 por S6K1, aunque no podemos excluir la posibilidad de que S6K1 lo que active sea una cinasa capaz de fosforilar RBR1, la cual se podría encontrar asociada al complejo S6K1-RBR1-E2Fb. Así, nuestros datos previos sugieren que una elevada expresión de S6K1 estabiliza el complejo RBR1-E2Fb, lo cual es esperable para potenciar el efecto represor de RBR1 en la expresión de genes del ciclo celular.

4.2. La represión de la CDKB1;1 por S6K1 en protoplastos

Los transcritos de CDKB1;1 y CDKB1;2 se acumulan durante las fases S, G2 y M del ciclo celular (Inzé y De Veylder 2006). Sin embargo, el pico de expresión de CDKB1;1 se encuentra en la transición de G2 a M (Boudolf *et al.*, 2004). Al medir la expresión de CDKB1;1 vemos que ésta aumentó en protoplastos *S6K1*(XVE-RNAi), lo cual indica que en las células WT esta CDK específica llevaría a la entrada en mitosis y se encontraría reprimida por la acción de las cinasas S6.

El G2 es la etapa en la que se produce el chequeo de si la célula ha cumplido una serie de requisitos par su entrada en mitosis, entre ellos el haber alcanzado un tamaño celular mitótico mínimo (Giménez-Abián *et al.*, 1988), el que se haya producido la individualización premitótica de cromátidas hermanas (Giménez-Abián *et al.*, 2000), así como la determinación de si el nivel de topoisomerasa II presente en G2 es suficiente para la posterior decatenación de cromátidas hermanas (Giménez-Abián *et al.*, 2002). También se controla el que se haya completado la reparación de cualquier lesión presente en el DNA (Pelayo *et al.*, 2001; Weingartner *et al.*, 2003; Pérez-Talavera *et al.*, 2003; De la Torre *et al.*, 2003), etc. El llamado chequeo G2 es, pues, el resultado de una serie de rutas de chequeo que actúan en paralelo. Cada una de ellas, al completarse comienza a dejar de enviar señales antimitogénicas para enviar las señales mitogénicas. la célula es capaz de calcular un balance final entre unas y otras señales de distinto signo. Cuando la cantidad de señales mitogénicas supera a la de antimitogénicas, se produce el paso a la etapa siguiente, aunque alguno de los requisitos se encuentres aún por completar. Ésta y no otra es la base de la llamada “adaptación a chequeos”. Esta tesis sugiere que la inducción del ciclo microtubular y su acople al ciclo de condensación cromosómico es uno de los requisitos imprecindibles para la entrada en mitosis, que está controlado por ruta de chequeo.

5. La disminución de cinasas S6 induce endomitosis que resulta en poliploidización

En esta tesis, hemos obtenido evidencia que demuestra que el nivel de expresión de los genes *S6K1* y *S6K2* incrementa la ploidía en *Arabidopsis* y tal incremento es semejante en hojas y en yemas florales. No existe, pues, especificidad tisular para el caso de ambos tejidos en proliferación. Pero la inducción de poliploidización no es sino secundaria a la inducción de endomitosis.

5.1. La inducción de endomitosis

El embrión homocigoto *s6k1s6k2* es inviable. Sin embargo, son ya viables tanto los heterocigotos *+/s6k1s6k2* como las plantas *S6K1*(XVE-RNAi). Ambos presentan constitutivamente niveles reducidos de la expresión de los genes *S6K1* y *S6K2*, aunque que *S6K1* deja de expresarse selectivamente sólo en los protoplastos *S6K1*(XVE-RNAi).

Las células pueden acumular un alto contenido de DNA debido a dos procesos diferentes: endo-replicación o endomitosis. Mientras la endo-replicación tiene como resultado cromosomas politénicos, en la endomitosis se produce un incremento en el número de cromosomas (Edgar y Orr-Weaver, 2001). La tinción con DAPI de cromocentros y el análisis de centrómeros a través de ensayos FISH en células epidérmicas de hojas y de yemas florales de plantas *+/s6k1s6k2* y de las plantas *S6K1*(XVE-RNAi) demostraron que el aumento en la ploidía al disminuir la presencia de las cinasas S6 se debe a un incremento en el número de cromosomas.

Bernstein y colaboradores (2007) demostraron que varias proteínas ribosomales y específicamente las S6 son necesarias, y que su concentración es importante, para que tenga lugar la supresión del ciclo proliferativo en levaduras, y para la supresión del crecimiento de tumores en *Drosophila* (Stewart y Denell, 1993; Volarevic *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 1992), *zebrafish* (MacInnes *et al.*, 2008), ratón

(Panic *et al.*, 2006), y células humanas (Sulic *et al.*, 2005). Más aún, la concentración de S6 es importante para el control de tal crecimiento.

La inducción de poliploidía celular es un proceso que se inicia tanto en células vegetales como en animales en respuesta a estrés. En las plantas, la poliploidización celular es un proceso muy común. Los niveles de ploidía, en general, se incrementan de forma espontánea en plantas silvestres al aumentar la altitud a la que una misma especie crece. Esta es una respuesta a estrés ambiental que se puede relacionar con la bajada de temperatura (que se produce al incrementar la altura) y la exquisita termosensibilidad del ensamblaje de tubulina (Gerhard *et al.*, 1997). En este sentido, la baja disponibilidad de tubulina autoensamblada induciría una parada transitoria en G2 por chequeo.

Las células ya poliploides presentan características que las hace ser más resistentes a situaciones de estrés tales como las inducidas por daño excesivo en su DNA producido por irradiación (Brodsky y Uryvaeva, 1985).

Un contenido de DNA mayor en el núcleo de algunas de las células de un organismo puede tener dos causas. Puede ser el resultado de una ronda suplementaria de endo-replicación (G1-S-G2/G1-S-... = re-replicación), dando lugar a la presencia de cromosomas politénicos, como ocurre de forma espontánea en las células que constituyen los tricomas de la superficie de la hoja en plantas WT.

El recuento de cromocentros muestra que la carencia o depleción de las cinasas S6Ks tanto en las plantas mutantes *++/s6k1s6k2* como en las *S6K1*(XVE-RNAi) induce poliploidización y que dicha poliploidización no es debida a la inducción de politenía por endo-replicación, un proceso que se produce espontáneamente en los tricomas de esta planta (ver figura 22), sino por endomitosis (Figura 11). Esto es la consecuencia de la duplicación del número cromosómico de 2n (10 cromosomas) a 4n (20 cromosomas), que se inicia de forma espontánea en las plantas WT (que son diploides y en menor frecuencia tetraploides), y que alcanzan niveles de 8n (diploides, tetraploides y octoploides), tanto en las plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* como en las plantas *S6K1*(XVE-RNAi).

La inducción de endomitosis, en células previamente diploides, lleva a la producción de células auto-tetraploides, que obviamente presentan un tamaño medio doble que el de cualquier célula diploide.

Las células que cursan la endomitosis presentan niveles altos de los factores de transcripción E2Fa y E2Fb, así como de la CDKB1;1. La endomitosis lleva a la obtención de células poliploides por fallo en el acople del ciclo microtubular al ciclo de condensación cromosómica (Weingartner *et al.*, 2004).

La endomitosis, pues, se caracteriza por un comienzo de mitosis normal, con condensación cromosómica y segregación de centrómeros hermanos, aunque no mediada por el huso mitótico. Por ello no se va a producir la debida segregación a distintos polos del huso de los cromosomas hermanos, ni tampoco la citocinesis o a la formación del fragmoplasto para separar a las dos células hijas una vez que la previa distribución de cromosomas hermanos haya tenido lugar. Como consecuencia, la única célula resultante de una endomitosis habrá duplicado el número de sus cromosomas en relación a los presentes en ella misma al iniciar mitosis, es decir, habrá duplicado su ploidía. Así, de un único núcleo diploide ($2n$) ya replicado ($4C$) que haya iniciado la condensación cromosómica en G2 ($2n$, $4C$), después de una endomitosis se forma un único núcleo tetraploide en el G1 del ciclo siguiente ($4n$, $4C$).

El incremento observado de ploidía secundario a la inducción de endomitosis en plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$ y en plantas $S6K1(XVE-RNAi)$ sugieren que las S6Ks y en particular la S6K1 están involucradas en la regulación de la transición de G2 a mitosis, en plantas silvestres.

La endomitosis se puede producir por exceso de señales mitogénicas en G2, señales que anticipan la entrada en mitosis. Cuando la supresión de la expresión de un gen anticipa la entrada en una etapa subsiguiente del ciclo celular sólo puede significar que dicho gen codifica una proteína represora del ciclo celular, o en otras palabras, que codifica una proteína antimitogénica, como cualquiera de las proteínas que intervienen en las rutas de chequeo que controlan transiciones irreversibles entre fases sucesivas del ciclo celular, tales como la de G2 a mitosis.

Ahora bien, esa anticipación significa bien que se ha suprimido una ruta de chequeo, o que una vez activada el bloqueo del ciclo ha caducado ya, por la llamada adaptación a chequeos, como acabamos de ver (apartado 3.2.). Este proceso de entrada en una etapa posterior del ciclo, a pesar de que la ruta de chequeo en principio la estaba frenando para impedir que la falta de un requisito importante hiciera fallar la propia mitosis, nos proporciona información sobre el proceso que activaba dicha ruta de chequeo. En el caso concreto de la respuesta a depleción en las cinasas S6 en G2, lo que se produce es una alternativa a la mitosis, la endomitosis.

Una ventaja experimental de la adaptación a chequeos es que cuando la célula salta finalmente a la etapa siguiente con algún requisito aún por cumplir, la naturaleza de éste se pone de manifiesto. Con estas consideraciones sobre la adaptación al chequeo que tiene lugar en la etapa premitótica o G2 del ciclo celular, se infiere que las cinasas S6, en las células de las plantas silvestres, en las que su expresión no se halla restringida, se ocupan de coordinar en G2 el ensamblaje y funcionamiento del fragmoplasto en relación al ciclo de condensación cromosómica (Utrilla *et al.*, 1993).

La formación de algunas células tetraploides junto a las diploides en las hojas de las plantas WT en la etapa de desarrollo estudiado sugiere que a lo largo del desarrollo foliar se puede estar produciendo una depleción espontánea en esta cinasa en las células diploides que ya han recorrido, al menos, un ciclo.

Tanto las células epidérmicas foliares como las células de las yemas florales de las plantas heterocigotas *++/s6k1s6k2* como *S6K1(XVE-RNAi)* llegaban a niveles de ploidía por encima del diploide hasta alcanzar el octoploide.

5.2. Determinación de ploidía por citometría de flujo y por FISH

La determinación de ploidía se viene haciendo por citometría de flujo, en células ajenas al tricoma, aunque es obvio, en el caso de la existencia de subpoblaciones con diferentes ploidías, la sola determinación del contenido de DNA en

un núcleo puede resultar equívoco. El inconveniente que presenta la determinación de ploidía por citometría de flujo se presenta al obtener picos de poblaciones celulares con un contenido 2C ya que puede tratarse de células haploides (1n) que se encuentran en fase G2 del ciclo celular o de células diploides (2n) que se encuentran en fase G0/G1. De forma análoga, células con un contenido en DNA igual a 4C determinado por citometría de flujo pueden ser células diploides (2n) que se encuentran en fase G2 o células tetraploides (4n) que se encuentran en fase G0/G1. Por lo tanto, al determinar la ploidía de células por citometría de flujo, que presenta la ventaja de ser un método cuantitativo rápido de realizar, se presenta el inconveniente de saber exactamente cuál es la ploidía de las células en cuanto al número de cromosomas presentes. La citometría de flujo es un método válido cuando se comparan poblaciones diferentes de células en iguales condiciones de crecimiento para ver cambios en el patrón de distribución de estas células en cuanto al su contenido de DNA (C).

La tinción con DAPI de los cromocentros y los análisis por FISH del número de centrómeros totales así como de los centrómeros correspondientes al par cromosómico 1 de su genoma en plantas *+/+/s6k1s6k2* y *S6K1(XVE-RNAi)* mostraron que el elevado nivel de ploidía observado en las células de estas plantas se debe a un incremento en el número de cromosomas producido al finalizar la endomitosis y no al proceso alternativo de endo-replicación, dado que como ya hemos comentado, mientras que la endo-replicación tiene como consecuencia la aparición de cromosomas politénicos, la endomitosis se caracteriza por una duplicación del número de cromosomas (Edgar y Orr-Weaver, 2001). En este contexto, Weingartner y colaboradores (2004) mostraron que, en líneas de tabaco que expresan de forma ectópica una ciclina B, es decir, que sobreexpresan una ciclina de las llamadas mitóticas que adelantan la entrada en mitosis, también se produce endomitosis en lugar de desarrollarse una mitosis convencional, al inhibirse de forma selectiva la formación del fragmoplasto al final de la mitosis.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una herramienta efectiva para determinar la ploidía de las células de *Arabidopsis*. El mayor avance el estudio de cromosomas en *Arabidopsis* fue el uso de FISH para la detección directa de secuencias de DNA en cromosomas (Koornneef *et al.*, 2003). Las secuencias repetidas

centroméricas (pAL1b) (Martinez-Zapater *et al.*, 1986), presentes en todos los cromosomas, y paracentroméricas (pAR21) (Simoens *et al.*, 1988), presentes en los cromosomas 1, permiten determinar con exactitud el número de cromosomas presentes en células en interfase. Sin embargo, la sonda pAR21 hibrida también con los cromosomas 4 y 5 si se aumenta su concentración. Esto indica que el grado de repetición es considerablemente mayor en los cromosomas 1 que en esos dos pares adicionales que también presentan alguna de las secuencias paracentroméricas que la sonda pAR21 detecta.

Al observar los cromosomas teñidos con DAPI obtenemos un número variable de señales, entre 6 y 12, diferente del número real de cromosomas en una célula diploide. Esto se debe al hecho de que los cromosomas 2 y 4 de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia presentan organizadores nucleolares (NORs) en ellos. Los NORs se tiñen con DAPI por ser zonas ricas en A-T afines a esa tinción. Las regiones de heterocromatina visibles durante la interfase de las células que se tiñe con DAPI son llamadas cromocentros (Fransz y Schubert, 2003).

La sonda pAL1b hibrida sólo con zonas centroméricas presentes en todos los cromosomas en interfase, esto nos permite determinar el número de centrómeros y por lo tanto el número de cromosomas presentes en un núcleo y deducir así su ploidía. También realizamos FISH usando la sonda pAR21 que, aunque puede conducir a error si se usa una concentración de la sonda mayor a la óptima, nos permite determinar de una forma aún más rápida que la sonda pAL1b la ploidía de la células. Una célula diploide (2n) en interfase hibridada con la sonda pAR21, tendrá 2 señales, una célula tetraploide (4n) presentará 4 señales y una octoploide (8n), 8 señales. Todo ello independientemente de que dichos centrómeros estén previamente ya replicados incluso en replicación. El menor número de cromosomas 1 facilita el recuento en relación a la cuantificación de señales de la sonda pAL1b que hibrida con todos los centrómeros. Así, una células diploide en interfase presentará 10 señales, una tetraploide, 20 señales y una octoploide, 40 señales, al ser hibridada con la sonda pAL1b.

En conclusión, la sonda pAR21 (aunque también la sonda pAL1b) permite discriminar si un núcleo cuyo contenido sea 4C en una hoja corresponde a una célula diploide en G2 (2n, 4C) o, por el contrario corresponde a una célula tetraploide en G1 (4n, 4C). Este método complementa cualquier estudio por citometría de flujo, resolviendo la incertidumbre en la interpretación de los datos de contenido en DNA obtenidos por citometría de flujo. La técnica FISH permite cuando se aplica, bien para centrómeros o para zonas paracentroméricas presentes, cuantificar de forma directa e incontrovertible la frecuencia de células con distintas ploidías, que coexisten en un mismo tejido.

5.3. La existencia de variaciones en la condensación y descondensación de secuencias centroméricas

Hay casos en que la estructura del centrómero no tiene forma de bola, sino que adquiere otras configuraciones. Esto quiere decir que mantener una estructura estable en el centrómero es una consecuencia del mantenimiento de ciertas condiciones funcionales de las propias secuencias centroméricas o de otras secuencias próximas a ellas. Así hemos podido ver que se forma una estructura alargada que puede indicar asociaciones entre centrómeros de cromosomas distintos (Figura 12). La desaparición de alguno de los centrómeros que se ha relacionado con situaciones de estrés como la producida por infecciones (Pavet *et al.*, 2006). Sin embargo, en esta tesis hemos dejado sin tocar este importante tema porque se aleja de la línea argumental seguida en esta tesis, pero cuya importancia es obvia y puede ser objeto de estudios posteriores.

6. Efecto de las S6Ks en el tamaño final de las células diferenciadas de la epidermis de la hoja

Otro efecto de la disminución de los niveles de expresión de las cinasas S6Ks, independiente de su comportamiento como proteínas de chequeo en el

ciclo proliferativo, es que la elongación o expansión de las células se ve específicamente inhibida. La pared celular de las células de la epidermis foliar crece y de forma notable, pero el volumen de la célula (una función directa del área) no aumenta, sino que la pared celular adquiere una configuración indentada. El volumen celular medio es aproximadamente la mitad en hojas de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* que en las de plantas de tipo silvestre, cuando se estudia una hoja pequeña como la hoja 3 (Figura 8). Sin embargo, la desproporción entre los tamaños de hojas de plantas silvestres y hojas de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* y de plantas *S6K1(XVE-RNAi)* es mayor entre las hojas 4 y 10, que son las que influyen más en la determinación de los tamaños relativos de la parte aérea de la planta, como un todo.

El estudio por microscopía electrónica de barrido y la medición de los tamaños celulares en hojas de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* y de plantas *S6K1(XVE-RNAi)* en relación a las plantas silvestres ha mostrado que el menor tamaño de una hoja, como la 3, que se mantiene relativamente pequeña incluso en plantas WT, se debe al menor tamaño de las células epidérmicas del pavimento foliar, cuando disminuyen los niveles de las cinasas S6.

El paradigma de los genes de chequeo es el gen *wee1* en *S. pombe* que llevaba a disminuir el tamaño mitótico, denominado regulador del ciclo celular por chequeo o retroalimentación (*feedback*). Posteriormente se determinó que los mutantes *wee* eran incapaces de realizar la fosforilación antimitogénica de la *cdc2* (el equivalente de la subunidad CDK en células de mamíferos), por lo que dicha *cdc2* se encontraba constitutivamente inducida. Con ello, estas células carecían prácticamente de G2 y entraban en mitosis con un tamaño mucho menor al que presentan las células silvestres (Nurse y Thuriaux, 1980). La carencia continua de cinasas S6Ks mimetiza el efecto de la carencia del gen *wee1* en *S. pombe*.

7. La formación de estomas en la hoja es independiente del contenido en cinasas S6

Como hemos visto en la figura 8A, la densidad de estomas presentes en las hojas de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* aumenta en relación al WT, pero su

número se mantiene. La disminución de los niveles de S6Ks no afecta a este tipo celular. Es decir, no se produce ni un incremento, ni una disminución en el número de estomas (células ya diferenciadas de la propia hoja), sólo se incrementa su densidad, tanto en el heterocigoto *+/s6k1s6k2* como las plantas en las que la expresión de la cinasa S6K1 ha sido inhibida por RNAi, debido a que ese número fijo se produce en una hoja de menor tamaño. La constancia en el número de ciclos que las células han debido pasar hasta llegar a diferenciarse parece ser una constante.

8. La politenía espontánea del tricoma y su respuesta a la disminución de la expresión de las cinasas S6

En la presente tesis hemos observado cómo una baja expresión de *AtS6K1* y de *AtS6K2* en plantas mutantes *+/s6k1s6k2* y *S6K1(XVE-RNAi)* también se correlaciona con un incremento en el contenido en DNA nuclear y con el desarrollo de tricomas con múltiples ramificaciones en las hojas.

En los tricomas de hojas de plantas de tipo silvestre ocurre endoreplicación, es decir se replica el DNA sin que ocurra mitosis. Este proceso da lugar a cromosomas politénicos con un alto contenido de DNA. Sin embargo, el número de cromosomas no cambia, y en este caso se mantiene igual a diez (el número de cromosomas del diploide).

En tricomas de plantas de tipo silvestre, la mayoría de los tricomas contienen 3 ramificaciones, aunque en una frecuencia mucho menor se observan unos pocos con 4 y excepcionalmente aparece incluso alguno con 5 ramificaciones. La proporción de tricomas con 4 ramificaciones es casi la misma que la de tricomas con 3 ramificaciones en el heterocigoto *+/s6k1s6k2*, donde aparecen, además, algunos con 5 ramificaciones. Sólo en plantas donde se han inhibido parcialmente tanto la cinasa S6K1, como la S6K2 (planta *S6K1(XVE-RNAi)*), se produce un desplazamiento hacia valores mayores de 3, llegando a 6 ramificaciones por tricoma. Por ello, vemos que la disminución de los niveles de las cinasas S6 correlaciona con replicación sin mitosis intermedias, es decir, con politenización. Es curioso que tanto endomitosis como endo-

replicación son dos alternativas que acortan fases del ciclo celular (G2) cuya inducción parece tener lugar como alternativa a la mitosis (Figura 21).

En tricomas de plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* observamos que los núcleos presentan más de diez cromocentros que corresponden a más de diez centrómeros (Figura 22). Además, los el tamaño de los centrómeros en este caso no es compatible con que éstos sean politénicos (ver los del WT). La disminución de las S6Ks produciría en primer lugar una ronda de endomitosis con duplicación en el número de cromosomas y posteriormente rondas de endo-replicación dando lugar a un núcleo politénico con 20 cromosomas. Se dan pues endomitosis y endo-replicación sucesivas. Lo mismo sucedería en el caso de tricomas de hojas de plantas *S6K1*(XVE-RNAi).

La aparición de tricomas con más de tres brazos se ha interpretado como un incremento en los niveles de E2Fa (Desvoves *et al.*, 2006). La presencia de tricomas con un mayor número de ramificaciones en plantas heterocigotas *+/s6k1s6k2* y en las plantas *S6K1*(XVE-RNAi), en relación a las presentes en las plantas WT, es un fenotipo que correlaciona con un incremento en el contenido de DNA (Hülkamp, 2004). Hemos podido comprobar que existe una correlación entre la ploidía de la planta y el número de ramificaciones de los tricomas y que para una primera determinación rápida del grado de ploidía, se puede analizar el número de ramificaciones de sus tricomas foliares.

En células de tabaco BY-2 un incremento en los niveles de E2Fb promueve la proliferación celular y la inducción de endo-replicación, es decir, la inducción de una nueva ronda de replicación sin mitosis, dando lugar a cromosomas politénicos, mientras que inhibe la expansión celular (Magyar *et al.*, 2005; Sozzani *et al.*, 2006).

9. Cambios en la fórmula floral, anteras y silicuas y en la ploidía del gametofito masculino que acompañan a la disminución de las cinasas S6

En las flores de plantas de las líneas $++/s6k1s6k2$ y $S6K1$ -RNAi observamos un incremento en el número de pétalos. La formación de órganos florales extras es característico también de líneas mutantes que presentan un aumento del tamaño de sus meristemas, tales como *CLAVATA1-3* y *ULTRAPETALA* (Carles *et al.*, 2004). Por el momento queda por demostrar si las cinasas S6 podrían actuar como represoras del abandono del meristemo floral, evitando así la elongación prematura de sus células.

Se sabe que la poliploidía en *Arabidopsis* produce una variación en la morfología de las flores, incrementando el tamaño de éstas y reduciendo la fertilidad (Comai, 2005; Henry *et al.*, 2005). Las líneas de plantas $++/s6k1s6k2$ y de plantas $S6K1$ (XVE-RNAi) presentan estas características anormales típicas de poliploides. Sin embargo no pudimos demostrar en qué momento durante el aislamiento de los mutantes S6K y de la generación de las líneas RNAi las plantas se volvieron poliploides. El incremento de la ploidía indicó que las células que forman los gametos o los gametos mismos podían sufrir anormalidades mitóticas o meióticas debido a la alteración del ciclo celular.

La detección de un número doble de cromosomas (10 en cada polo) durante anafase I en meiocitos masculinos de las líneas $++/s6k1s6k2$ y $S6K1$ (XVE-RNAi) indica que las células tetraploides - inducidas por endomitosis - son capaces de llevar a cabo una meiosis normal.

La poliploidía es bien tolerada en plantas (Comai, 2005). Las plantas producen gametos diploides (derivados de células tetraploides) en un porcentaje de alrededor del 5% el cual permite la transmisión meiótica del estado tetraploide (Otto, 2007).

Al analizar anteras y silicuas vemos que en las plantas heterocigotas $++/s6k1s6k2$ el desarrollo de éstas es anormal (Figura 24). Las anteras presentan un menor número de polen viable, lo cual se constata al analizar la distribución de las

frecuencias de semillas abortadas que alcanza un 49% en plantas heterocigotas $+/+s6k1s6k2$ y un 51% en plantas $S6K1(XVE-RNAi)$. Estas observaciones son ratificadas por el menor número de semillas producidas en las anteras de estas plantas.

CONCLUSIONES

En esta tesis se ha estudiado el papel de los genes *S6K1* y *S6K2* en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia. Como la mutación doble en homocigosis de ambos genes parecía ser letal para *Arabidopsis*, se usaron tanto plantas mutantes heterocigotas *+/s6k1s6k2* como plantas *S6K1*(XVE-RNAi), en los que la cantidad de ambas cinasas de la proteína S6 del ribosoma eucariótico estaba disminuida por el silenciamiento del gen *S6K1* mediante interferencia con RNA bicatenario (RNAi). También se estudió la respuesta al silenciamiento parcial de ambos genes en protoplastos obtenidos de plantas silvestres. Las principales conclusiones de esta tesis son:

1. La carencia parcial constitutiva de cinasas S6 produce distintos grados de enanismo en comparación al tamaño de la parte aérea de plantas de tipo silvestre.
2. En la hoja, tanto de plantas *+/s6k1s6k2* como de las *S6K1*(XVE-RNAi), dicho enanismo va acompañado de una disminución en los tamaños finales alcanzados por las células epidérmicas durante la elongación que lleva a su diferenciación. Se produce un alargamiento de la pared celular sin que el volumen de su contenido aumente, con lo que la célula resulta de menor tamaño y con la pared celular ondulada. Esta alteración es el principal responsable del fenotipo enano.
3. En las células en proliferación, la disminución del nivel de cinasas S6 produce la aparición de una variante de la mitosis, la endomitosis, cuya característica más notable es la falta de fragmoplasto y por ello la ausencia de división celular. La resolución de endomitosis conduce a un incremento importante en el número de células poliploides en relación a las presentes en plantas silvestres, tanto en células epidérmicas como en las de yemas florales.
4. En protoplastos obtenidos de plantas silvestres, la respuesta a corto plazo producida por la disminución de ambos genes *S6Ks* al usar RNAi para el gen

S6K1 viene acompañada por la sobreexpresión de la cinasa CDKA y de la CDK específica de G2, CDKB1;1 que induce la transición irreversible de G2 a mitosis. También se produce un incremento de las dos subunidades del heterodímero que constituye el factor de transcripción E2Fb y DPa. Simultáneamente, la actividad fosforilativa de las CDKs, medida por fosforilación de histona H1, se incrementa, como ocurre en el paso G2 a mitosis en un ciclo celular normal.

5. La disminución constitutiva del nivel de cinasas S6 no afecta al número de ciclos recorridos por las células proliferantes de un tejido. Así, el número total de células de la hoja es semejante al que presentan las hojas de plantas silvestres. El nivel de cinasas S6 tampoco afecta a la inducción de las divisiones intercaladas entre la células ya diferenciadas de la hoja, responsables de la formación tardía de estomas.
6. La disminución en los niveles de las cinasas S6 produce un cambio en la fórmula floral en plantas *++/s6k1s6k2* y *S6K1(XVE-RNAi)*, incrementándose el número de pétalos de 4 a 5, 6 ó 7. Las anteras y las silicuas de plantas mutantes *++/s6k1s6k2* presentan un desarrollo menor que las de plantas de tipo silvestre. Esta disminución se acompaña también de un aumento del 1 al 50% en el número de semillas abortadas.
7. Las plantas con la mutación en heterocigosis *++/s6k1s6k2* y las plantas *S6K1(XVE-RNAi)* producen meiocitos masculinos preferentemente 2n, que corresponden a meiosis de núcleos inicialmente tetraploides. No se observan alteraciones en dichas meiosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An C, Sawada A, Fukusaki E, Kobayashi A. 2003. A transient RNA interference assay system using *Arabidopsis* protoplasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 2674-7
- Anthony RG, Henriques R, Helfer A, Meszaros T, Rios G, Testerink C, Munnik T, Deak M, Koncz C, Bögre L. 2004. A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **23**: 572-81
- Barroco RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inzé D, Mironov. 2003. Novel complexes of cyclin-dependent kinases and cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 401-12
- Beemster GT, Baskin TI. 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**: 1515-26
- Beemster GTS, Fiorani F, Inzé D. 2003. Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci.* **8**: 154-8
- Bettencourt-Dias M, Giet R, Sinka R, Mazumdar A, Lock WG, Balloux F, Zafiropoulos PJ, Yamaguchi S, Winter S, Carthew RW, Cooper M, Jones D, Frenz L, Glover DM. 2004. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature.* **432**: 980-7
- Bjorklund M, Taipale M, Varjosalo M, Saharinen J, Lahdenpera J, Taipale J. 2006. Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. *Nature.* **439**: 1009-13
- Blais A, van Oevelen CJ, Margueron R, Acosta-Alvear D, Dynlacht BD. 2007. Retinoblastoma tumor suppressor protein-dependent methylation of histone H3 lysine 27 is associated with irreversible cell cycle exit. *J. Cell Biol.* **179**: 1399-412
- Bögre L, Ökrész L, Henriques R, Anthony RG. 2003. Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci.* **8**: 424-31
- Boudolf V, Vlieghe K, Beemster GTS, Magyar Z, Acosta JAT, Maes S, Van Der Schueren E, Inzé D, De Veylder L. 2004. The plant-specific Cyclin-Dependent Kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2683-92
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell.* **13**: 1499-51
- Chaubet-Gigot, N. 2000. Plant A-type cyclins. *Plant Mol. Biol.* **43**: 659-675

- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet.* **6**: 836-46
- Dahl M, Meskiene I, Bögre L, Ha DTC, Swoboda I, Hubmann R, Hirt H, Heberle-Bors E. 1995. The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs-4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell.* **7**: 1847-57
- Datar S, Jacobs H, de la Cruz A, Lehner C, Edgar B. 2000. The *Drosophila* Cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J.* **19**: 4543-54
- De la Torre C, Pincheira J, López-Sáez JF. 2003. Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. *Histol Histopathol.* **18**: 225-43
- De la Torre García-Quintana C. 2005. Aceleración y frenado de la proliferación celular. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* **71**: 535-69
- De Veylder L, Segers G, Glab N, Casteels P, Van Montagu M, Inzé D. 1997. The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett.* **412**: 446-52
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster G, de Almeida Engler J, Ormenese S, Maes S, Naudts M, Van Der Schueren E, Jacqumard A, Engler G, Inzé D. 2002. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* **21**: 1360-68
- Del Pozo JC, Díaz-Trivino S, Cisneros N, Gutiérrez C. 2006. The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the Ubiquitin-SCF^{SKP2A} pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18**: 2224-35
- Desvoyes B, Ramirez-Parra E, Xie Q, Chua N, Gutiérrez C. 2006. Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol.* **140**: 67-80
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG. 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev Biol.* **215**: 407-19
- Du W, Pogoriler J. 2006. Retinoblastoma family genes. *Oncogene* **25**: 5190-200
- Ebel C, Mariconi L, Gruissem W. 2004. Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature.* **429**: 776-80
- Edgar BA, Orr-Weaver TL. 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell.* **105**: 297-306
- Fabian-Marwedel T, Umeda M, Sauter M. 2002. The rice cyclin-dependent kinase-activating kinase R2 regulates S-phase progression. *Plant Cell.* **14**: 197-210

- Fingar D, Blenis J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**: 3151-71
- Fleming A.J. 2006. The co-ordination of cell division, differentiation and morphogenesis in the shoot apical meristem: a perspective. *J. Exp. Bot.* **57**: 25-32
- Folkers U, Berger J, Hülskamp M. 1997. Cell morphogenesis of trichomes in *Arabidopsis*: differential control of primary and secondary branching by branch initiation regulators and cell growth. *Development*. **124**: 3779-86
- Fransz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer TC, Torres-Ruiz RA, Jones G. 1998. Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**: 867-76
- Fransz PF, Armstrong S, de Jong JH, Parnell LD, van Drunen C, Dean C, Zabel P, Bisseling T, Jones GH. 2000. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell*. **100**: 367-76
- Fransz P, De Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I. 2002. Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 14584-9
- Fransz P, Soppe W, Schubert I. 2003. Heterochromatin in interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research*. **11**: 227-40
- Galbraith, D., Harkins, K., and Knapp, S. 1991. Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **96**: 985-989.
- Giménez-Abián JF, Clarke DJ, Giménez-Martín G, Weingartner M, Giménez-Abián MI, Carballo JA, Díaz de la Espina SM, Bögre L, De la Torre C. 2002. DNA catenations that link sister chromatids until the onset of anaphase are maintained by a checkpoint mechanism. *Eur J Cell Biol.* **81**: 9-16
- González-Fernández A, Giménez-Martín G, Fernández-Gómez ME, de la Torre C. 1974. Protein synthesis requirements at specific points in the interphase of meristematic cells. *Exp Cell Res.* **88**: 163-70
- Guertin DA, Guntur KVP, Bell GW, Thoreen CC, Sabatini DM. 2006. Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth and division. *Current Biology*. **16**: 958-70
- Hartwell LH. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev.* **38**: 164-98
- Henriques R, Jasik J, Klein M, Martinoia E, Feller U, Schell J, Pais M, Koncz C. 2002. Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene *IRT1* results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol Biol.* **50**: 587-97

- Henry IM, Dilkes BP, Young K, Watson B, Wu H, Comai L. 2005. Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. *Genetics*. **170**: 1979-88
- Heslop-Harrison JS, Murata M, Ogura Y, Schwarzacher T, Motoyoshi F. 1999. Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes. *Plant Cell*. **11**: 31-42
- Hirano H, Harashima H, Shinmyo A, Sekine M. 2008. *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation. *Plant Mol Biol*. **66**: 259-75
- Hittelman WN, Rao PN. 1978. Mapping G1 phase by the structural morphology of the prematurely condensed chromosomes. *J Cell Physiol*. **95**: 333-41
- Hülkamp M, Misera S, Jürgens G. 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell*. **76**: 555-66
- Hülkamp M, Schnittger A, Folkers U. 1999. Pattern formation and cell differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a genetic model system. *Int Rev Cytol*. **186**: 147-78
- Hülkamp M. 2004. Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. **5**: 471-80
- Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jager S, Greenwood J, Makker E, Jackman M, Xie Q, Bannister AJ, Kouzarides T, Gutiérrez C, Doonan JH, Murray JA. 1998. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol*. **37**: 155-69
- Inzé D, De Veylder L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet*. **40**: 77-105
- Irish VF. 2008. The *Arabidopsis* petal: a model for plant organogenesis. *Trends Plant Sci*. **13**: 430-6
- Ito, M. 2000. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol. Biol*. **43**: 677-690
- Jorgensen P, Tyers M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Current Biology*. **14**: 1014-27
- Joubès J, Chevalier C. 2000. Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology*. **43**: 735-45
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY^(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193-5
- Koornneef M, Fransz P, de Jong H. 2003. Cytogenetic tools for *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res*. **11**: 183-94

- Kozma SC, Thomas, G. 2002. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *BioEssays*. **24**: 65-71
- Leiva-Neto JT, Grafi G, Sabelli PA, Dante RA, Woo YM, Maddock S, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA. 2004. A dominant negative mutant of cyclin-dependent kinase A reduces endoreduplication but not cell size or gene expression in maize endosperm. *Plant Cell*. **16**: 1854-69
- López-Sáez JF, González-Fernández A, de la Torre C, Díez JL, Fernández-Gomez ME, Navarrete MH, Garcíz-Herdugo G, Giménez-Martín G. 1975. A model for cell cycle and growth kinetics in roots. *J Theor Biol*. **53**: 463-73
- Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bakó L, Koncz C, Dudits D. 1997. Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*. **9**: 223-35
- Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bako L, Inzé D, Bögre L. 2005. The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin dependent cell division. *Plant Cell*. **17**: 2527-41
- Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DPS. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 Kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*. **18**: 477-90
- Martínez-Zapater JM, Estelle MA, Somerville CR. 1986. A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet*. **204**: 417-23
- Matsuo T, Kubo Y, Watanabe Y, Yamamoto M. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *EMBO J*. **22**: 3073-83
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW. 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **5**: 1661-8
- Menges M, Murray JA. 2002. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J*. **30**: 203-12
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA. 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J*. **41**: 546-66.
- Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Kamada H, Shinozaki. 1995. Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. **358**: 199-204
- Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. 1999. *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science*. **285**: 2126-9

- Nagl W. 1976. DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature*. **261**: 614-5
- Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A. 1999. Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex Cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant F*. **18**: 243-52
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A. 2002. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin/D-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell*. **14**: 1847-57
- Navarrete MH, Cuadrado A, Escalera M, Canovas JL. 1987. Regulation of G2 by cell size contributes to maintaining cell size variability within certain limits in higher plants. *J. Cell Sci*. **87**: 635-41
- Nurse P, Thuriaux P. 1980. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. **96**: 627-37
- Ormenese S, de Almeida Engler J, De Groodt R, De Veylder L, Inzé D, Jacqmard A. 2004. Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*. **93**: 575-80
- Otterhag L, Gustavsson N, Alsterfjord M, Pical C, Lehrach H, Gobom J, Sommarin M. 2006. *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie*. **88**: 11-21
- Otto, SP. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*. **131**: 452-62
- Panic, L, Tamarut, S, Sticker-Jantscheff, M, Barkic, M, Solter, D, Uzelac, M, Grabusic, K and Volarevic, S. 2006. Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation. *Mol Cell Biol* **26**: 8880-91
- Pavet V, Quintero C, Cecchini NM, Rosa AL, Alvarez ME. 2006. *Arabidopsis* displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact*. **19**: 577-87
- Pelayo HR, Lastres P, De la Torre C. 2001. Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. *Planta*. **212**: 444-53
- Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G. 2004. *S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-}* mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-Terminal Oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 Kinase pathway. *Mol. Cell. Biol*. **24**: 3112-24

- Porceddu A, Stals H, Reichheld J-P, Segers G, De Veylder L, de Pinho Barroco R, Casteels P, Van Montagu M, Inzé D, Mironov V. 2001. A plant-specific Cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 36354-60
- Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes and Dev.* **19**: 2199-211
- Ruvinsky I, Meyuhas O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem. Sci.* **31**: 342-8
- Sala F, Parisi B, Burroni D, Amileno AR, Pedrali-Noy G, Spadari S. 1980. Specific and reversible inhibition by aphidicolin in the alpha-like DNA polymerase of plant cells. *FEBS Lett.* **117**: 93-8
- Sánchez-Moran E, Armstrong SJ, Santos JL, Franklin FC, Jones GH. 2002 Variation in chiasma frequency among eight accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* **162**: 1415-22
- Sans J, De la Torre C. 1979. G0 and G0,2 cells identified by their chromatin pattern in dormant and proliferating meristems. *Eur. J. Cell Biol.* **19**: 294-8
- Sans J, Giménez-Martín G, De la Torre C. 1980. Onset of proliferation in dormant roots of *Allium cepa* L. bulbs. Kinetic analysis. *Biol. Cell.* **38**: 95-104
- Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, W B Hershey J, Blenis J, Pende M, Sonenberg N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.* **25**: 2781-91
- Shimotohno A, Matsubayashi S, Yamaguchi M, Uchimiya H, Umeda M, 2003. Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **534**: 69-74
- Simoens CR, Gielen J, Van Montagu M, Inzé D. 1988. Characterization of highly repetitive sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6753-66
- Singh M, Krajewski M, Mikolajka A, Holak TA. 2005. Molecular determinants for the complex formation between the Retinoblastoma protein and LXCXE sequences. *J. Biol. Chem.* **280**: 37868-76
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM. 1990. Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2**: 755-67
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murria JAH. 1995. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell.* **7**: 85-103

- Sorrell DA, Menges M, Healy JM, Deveau Y, Amano C, Su Y, Nakagami H, Shinmyo A, Doonan JH, Sekine M, Murray JA. 2001. Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **126**: 1214-23
- Sozzani R, Maggio C, Varotto S, Canova S, Bergounioux C, Albani D, Cella R. 2006. Interplay between *Arabidopsis* activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol.* **140**: 1355-66
- Stewart, MJ and Denell, R. (1993) Mutations in the *Drosophila* gene encoding ribosomal protein S6 cause tissue overgrowth. *Mol Cell Biol* **13**: 2524-2535.
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K. 2003. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **6**: 544-53
- Sulic, S, Panic, L, Barkic, M, Mercep, M, Uzelac, M and Volarevic, S. 2005. Inactivation of S6 ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response. *Genes Dev.* **19**: 3070-82
- Sung YH, Kim HJ, Lee HW. 2007. Identification of a novel Rb-regulated gene associated with the cell cycle. *Mol Cells.* **24**: 409-15
- Szabados L, Kovács I, Oberschall A, Ábrahám E, Kerekes I, Zsigmond L, Nagy R, Alvarado M, Krasovskaja I, Gál M, Berente A, Rédei GP, Haim AB, Koncz C. 2002. Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* **32**: 233-42
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* **408**: 796-815
- Thorlby G, Fourrier N, Warren G. 2004. The sensitive to freezing G2 gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a beta-glucosidase. *Plant Cell* **16**: 2192-203
- Timmers C, Sharma N, Opavsky R, Maiti B, Wu L, Wu J, Orringer D, Trikha P, Saavedra HI, Leone G. 2007. E2f1, E2f2, and E2f3 control E2F target expression and cellular proliferation via a p53-dependent negative feedback loop. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 65-78
- Traas J, Hülskamp M, Gendreau E, Höfte H. 1998. Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr Opin Plant Biol.* **1**: 498-503
- Tsakraklides V, Solomon MJ. 2002 Comparison of Cak1p-like cyclin-dependent kinase-activating kinases. *J Biol Chem.* **277**: 33482-9
- Turck F, Kozma SC, Thomas G, Nagy F. 1998. A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function *in vivo*. *Mol Cell Biol.* **18**: 2038-44

- Turck F, Zilbermann F, Kozma SC, Thomas G, Nagy F. 2004. Phytohormones participate in an S6 Kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**: 1527-35
- Vandenbussche F, Van Der Straeten D. 2004. Shaping the shoot: a circuitry that integrates multiple signals. *Trends Plant Sci.* **9**: 499-506
- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D. 2002. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **14**: 903-16
- Volarevic, S, Stewart, MJ, Ledermann, B, Zilberman, F, Terracciano, L, Montini, E, Grompe, M, Kozma, SC and Thomas, G. 2000. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science.* **288**: 2045-7
- Watson, KL, Konrad, KD, Woods, DF, Bryant, PJ. 1992 *Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 11302-6
- Weingartner M, Pelayo HR, Binarova P, Zwerger K, Melikant B, de la Torre C, Heberle-Bors E, Bögre L. 2003. A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J Cell Sci.* **16**: 487-98
- Weingartner M, Criqui MC, Meszaros T, Binarova P, Schmit AC, Helfer A, Derevier A, Erhardt M, Bögre L, Genschik P. 2004. Expression of a nondegradable Cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell.* **16**: 643-57
- Williams AJ, Werner-Fraczek J, Chang IF, Bailey-Serres J. 2003. Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. *Plant Physiol* **132**: 2086-97
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. 2007. An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One.* **2**: e718.
- Wulschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* **124**: 471-84
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Hannon GJ, Gutiérrez C. 1996. Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* **15**: 4900-8
- Zhang SH, Lawton MA, Hunter T, Lamb CJ. 1994a. atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. I. Isolation, characterization, and expression. *J Biol Chem.* **269**: 17586-92

- Zhang SH, Broome MA, Lawton MA, Hunter T, Lamb CJ. 1994b. atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. II. Functional and biochemical analysis of the encoded protein. *J Biol Chem.* **269**: 17593-9
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput Biol* **7**: 203-14
- Zhong XB, Hans de Jong J, Zabel P. 1996. Preparation of tomato meiotic pachytene and mitotic metaphase chromosomes suitable for fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.* **4**: 24-8
- Zuo J, Niu QW, Chua N-H. 2000. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* **24**: 265-73